



**João Miguel Duarte Rafael**

Licenciatura em Engenharia Biomédica

**Decomposição de aminoácidos  
alifáticos por transferência de electrão  
em colisões átomo-molécula**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Doutor Filipe Ribeiro Ferreira da Silva  
Co-orientador: Professor Doutor Paulo Manuel Assis Loureiro  
Limão-Vieira

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca  
Arguente: Prof. Doutora Maria Alice Santos Pereira  
Vogais: Prof. Doutor Paulo Manuel Assis Loureiro Limão Vieira  
Doutor Filipe Ribeiro Ferreira da Silva



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2013**



**João Miguel Duarte Rafael**

Licenciatura em Engenharia Biomédica

**Decomposição de aminoácidos alifáticos por transferência  
de electrão em colisões átomo-molécula**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Doutor Filipe Ribeiro Ferreira da Silva  
Co-orientador: Professor Doutor Paulo Manuel Assis Loureiro  
Limão-Vieira

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca  
Arguente: Prof. Doutora Maria Alice Santos Pereira  
Vogais: Prof. Doutor Paulo Manuel Assis Loureiro Limão Vieira  
Doutor Filipe Ribeiro Ferreira da Silva



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2013**

## **Decomposição de aminoácidos alifáticos por transferência de electrão em colisões átomo-molécula**

“*Copyright*” em nome de João Miguel Duarte Rafael, estudante do curso de Engenharia Biomédica, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

# Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, o Doutor Filipe Ferreira da Silva e ao meu co-orientador Professor Doutor Paulo Limão-Vieira pela oportunidade de realizar esta dissertação. Agradeço também a dedicação e disponibilidade que sempre demonstraram.

Um agradecimento especial ao engenheiro Diogo Almeida por toda a ajuda e esclarecimentos proporcionados ao longo do trabalho. Agradeço também a todos os elementos do LCAM pelo bom ambiente no laboratório e ajuda sempre que necessária.

Ao CEFITEC e ao Departamento de Física pelas condições de trabalho proporcionadas.

Queria também agradecer aos colegas de curso, em particular ao Nuno Costa, ao Ricardo Chorão e ao Sérgio Pereira pelo companheirismo e momentos de humor. Foi uma mais valia fazer o curso convosco.

À Dália por estar sempre ao meu lado e me apoiar e ajudar a superar os obstáculos e desafios que surgem na minha vida. Agradeço-te do fundo do meu coração.

À minha família e em especial aos meus pais, Maria de Lurdes e Fernando, pelo apoio incondicional e esforço para que nunca me faltasse nada. Obrigado por fazerem de mim quem sou.

Por último e mais importante, a Deus. Obrigado por tudo.



## Resumo

A interacção da radiação de alta energia (p.ex. raios-X, raios  $\gamma$ , partículas  $\alpha$ ) com o meio biológico produz ao longo do percurso de ionização diversas espécies secundárias (p.ex. iões, radicais, electrões) com potencial genotóxico mais relevante do que o da radiação primária. Das espécies formadas, electrões secundários de baixas energias são as mais abundantes. Ao interagir com o meio celular, estes electrões podem causar danos directos ou indirectos nos constituintes do ADN, focando-se este trabalho no dano indirecto. Devido ao muito curto tempo de vida dos electrões livres em meio biológico, os seus efeitos podem ser simulados recorrendo a uma espécie dadora de electrões.

O objectivo deste trabalho é estudar os padrões de fragmentação da alanina e valina, por colisões átomo-molécula. O padrão de fragmentação resultante é condicionado pela estrutura da molécula alvo, pela energia de colisão e pela presença do ião  $K^+$  no complexo de colisão. No presente trabalho a fragmentação da alanina e valina resulta da interacção de um feixe de potássio neutro com o alvo molecular, alanina e valina, a diferentes energias de colisão. Os fragmentos aniónicos produzidos por transferência de electrão são analisados por espectrometria de massa do tipo tempo de voo (TOF-*Time of Flight*).

Este estudo foi efectuado para energias de colisão entre 15 e 100 eV. Para ambos os aminoácidos foram detectados fragmentos que já haviam sido observados em estudos de captura electrónica dissociativa bem como fragmentos nunca antes reportados para estas moléculas. Foram propostos mecanismos de fragmentação tendo em atenção a energia disponível na colisão e considerados os efeitos biológicos adversos resultantes da formação destes fragmentos.

Palavras-chave: transferência de electrão, alanina, valina, potássio, colisões átomo-molécula





# Abstract

When high energy radiation (x-rays,  $\gamma$ -rays,  $\alpha$  particles) interacts with the biological medium, secondary species are created along the ionization track with genotoxic potential greater than the primary radiation. Among the species produced, low energy electrons are the most abundant. As they interact with the biological medium, these electrons may cause direct and indirect damage to the DNA, this work being focused on the latter processes. Due to the short lifetime of free electrons in the biological medium, their effects can be simulated by resorting to an electron donor.

The aim of this work is to study the fragmentation pattern of alanine and valine through atom-molecule collisions. The resulting fragmentation pattern depends on the structure of the target molecule, the collision energy and the presence of the  $K^+$  ion in the collision complex. In the present work the fragmentation of alanine and valine results from the interaction of a neutral potassium beam with the molecular target, alanine and valine, at different collision energies. The resulting ionic fragments are analyzed by Time of Flight mass spectrometry.

This study has been investigated in the energy range from 15 to 100 eV. For both amino acids, some fragments previously detected in dissociative electron attachment studies were observed as well as a few never before reported for these molecules. Fragmentation pathways were proposed, taking in consideration the available energy, and their biological consequences were discussed.

Keywords: electron transfer, alanine, valine, potassium, atom-molecule collisions



# Índice de Matérias

|   |      |
|---|------|
| Agradecimentos.....   | III  |
| Resumo.....   | V    |
| Abstract .....  | VII  |
| Índice de Matérias .....  | IX   |
| Índice de Figuras .....   | XI   |
| Índice de Tabelas.....  | XIII |
| Simbologia e notações.....  | XV   |
| Capítulo 1 Introdução.....  | 1    |
| 1.1. Objectivo .....  | 1    |
| 1.2. Enquadramento.....   | 1    |
| 1.3. Estrutura .....  | 3    |
| Capítulo 2 Processos de Dissociação Molecular .....   | 5    |
| 2.1. Captura electrónica (CE).....  | 5    |
| 2.2. Transferência de electrões (TE).....   | 6    |
| 2.3. Mecanismo "Harpoon" .....  | 7    |
| 2.4. Teoria de colisão e formação de pares de iões .....  | 9    |
| 2.4.1. Considerações sobre o modelo e tempo de colisão .....  | 9    |
| 2.4.2. Formalismo de Landau-Zener e probabilidade de transição não adiabática de Landau-Zener ..... | 9    |
| 2.4.3. Aproximação de Born-Oppenheimer .....  | 12   |
| 2.4.4. Colisão átomo-átomo .....  | 12   |
| 2.4.5. Colisão átomo-molécula.....  | 14   |
| Capítulo 3 Aminoácidos de cadeia alifática .....  | 15   |
| 3.1. Alanina .....  | 15   |
| 3.2. Valina .....   | 17   |
| 3.3. Estado da arte .....   | 18   |
| Capítulo 4 Montagem Experimental .....  | 21   |
| 4.1. Descrição Geral .....  | 21   |
| 4.2. Câmara de Potássio .....   | 22   |
| 4.2.1. Sistema de troca de carga .....  | 22   |
| 4.2.2. Placas deflectoras .....   | 23   |
| 4.3. Câmara de Colisões .....   | 24   |

|  |    |
|--|----|
| 4.3.1. Detector Langmuir-Taylor.....                                   | 24 |
| 4.3.2. Forno de moléculas sólidas .....                                | 25 |
| 4.4. Espectrómetro de massa do tipo Tempo de Voo .....                 | 26 |
| 4.4.1. Lentes Einzel .....   | 27 |
| 4.4.2. Detector do tipo Canaltrão.....                                 | 27 |
| 4.4.3. Espectros de Massa .....  | 28 |
| 4.5. Tecnologia de Vácuo.....  | 28 |
| Capítulo 5 Resultados e discussão.....                                 | 31 |
| 5.1. Condições experimentais.....                                      | 31 |
| 5.2. Tratamento e calibração de espectros.....                         | 33 |
| 5.3. Resultados .....  | 34 |
| 5.3.1. Resultados dos espectros a baixas, médias e altas energias..... | 34 |
| 5.3.2. Análise dos fragmentos obtidos.....                             | 38 |
| 5.3.2. Fracções aniónicas.....   | 46 |
| Capítulo 6 Conclusões e trabalho futuro .....                          | 49 |
| 6.1. Conclusões .....  | 49 |
| 6.2. Trabalho futuro.....  | 49 |
| Referências .....  | 51 |
| Anexos.....  | 55 |

# Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.1 – Diagrama temporal dos vários estágios da irradiação.....   | 2  |
| Figura 2.1 - Esquema sequencial do mecanismo de harpoon <sup>[15]</sup> .....   | 8  |
| Figura 2.2 – Representação esquemática da intersecção das curvas potenciais do K-Br <sub>2</sub> e K <sup>+</sup> -Br <sub>2</sub> <sup>-</sup> no ponto de cruzamento R <sub>c</sub> . Adaptado da referência <sup>[14]</sup> .....  | 8  |
| Figura 2.3 – Representação esquemática de curvas não adiabáticas, iónica e covalente, representando a colisão entre dois átomos consoante a distância internuclear <sup>[17]</sup> .....  | 10 |
| Figura 2.4 – Representação das quatro trajetórias possíveis numa colisão entre um átomo alcalino e uma molécula. O círculo interior corresponde à região repulsiva dos potenciais <sup>[17]</sup> .....   | 11 |
| Figura 2.5 – Curvas de energias potenciais de Born-Oppenheimer, ilustrando a afinidade electrónica adiabática AE(AB) <sup>[15]</sup> .....  | 12 |
| Figura 2.6 – Representação esquemática da evolução dos estados adiabáticos dependendo da distância internuclear <sup>[17]</sup> . A curva azul corresponde ao estado adiabático covalente e a vermelha ao estado adiabático iónico. As curvas a tracejado representam os estados não adiabáticos covalente (vermelho) e iónico (azul).....                        | 13 |
| Figura 3.1 – Estrutura química da Alanina. A azul átomo de N, a vermelho átomos de O, a preto átomos de C e a cinzento átomos de H.....   | 15 |
| Figura 3.2 – Esquema do ciclo glucose-alanina. Adaptado da referência <sup>[21]</sup> .....   | 16 |
| Figura 3.3 – Promoção comercial dos usos da Alanina <sup>[24]</sup> .....   | 16 |
| Figura 3.4 – Estrutura química da valina. A azul átomo de N, a vermelho átomos de O, a preto átomos de C e a cinzento átomos de H. ....   | 17 |
| Figura 3.5 – Promoção comercial dos usos da valina <sup>[28]</sup> .....  | 18 |
| Figura 4.1 – Esquema da montagem experimental. Câmara de potássio: a) Fonte de potássio iónico b) Forno de potássio neutro c) Forno de troca de carga d) Placas deflectoras. Câmara de colisão: e) Detector Langmuir-Taylor f) Forno de moléculas sólidas g) Zona de colisão h) Lentes Einzel i) Tubo de tempo de voo j) Detector Canaltrão <sup>[17]</sup> ..... | 21 |
| Figura 4.2 – Representação esquemática do sistema de troca de carga <sup>[17]</sup> .....   | 22 |
| Figura 4.3 – Esquema da montagem das placas deflectoras <sup>[48]</sup> .....   | 23 |
| Figura 4.4 – Esquema da montagem do detector Langmuir-Taylor <sup>[48]</sup> .....  | 24 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 4.5 – Montagem do forno de moléculas sólidas: a) forno de moléculas sólidas b) tubo de introdução de amostras líquidas ou gasosas c) termopar d) lâmpada de halogénio e) reflector.....     | 25 |
| Figura 4.6 – Esquema do forno de moléculas sólidas: a) ponteira capilar b) cilindro exterior c) contentor de amostra <sup>[17]</sup> .....   | 26 |
| Figura 4.7 – Esquema do sistema de extracção e detecção. 1) Placa de extracção 2) Rede de extracção 3) Rede de aceleração 4) Sistema de lentes Einzel 5) Placas deflectoras. <sup>[17]</sup> ..... | 26 |
| Figura 4.8 – Tensões aplicadas na base do TOF <sup>[17]</sup> .....  | 27 |
| Figura 4.9 – Esquema da configuração electrónica do canaltrão para detecção de aniões <sup>[17]</sup> .....  | 27 |
| Figura 5.1 – Espectro da alanina a 15 eV.....  | 34 |
| Figura 5.2 – Espectro da alanina a 30 eV.....  | 35 |
| Figura 5.3 – Espectro da alanina a 100 eV.....   | 35 |
| Figura 5.4 – Espectro da valina a 15 eV.....   | 36 |
| Figura 5.5 – Espectro da valina a 30 eV.....   | 36 |
| Figura 5.6 – Espectro da valina a 100 eV.....  | 37 |
| Figura 5.7 – Fracções aniónicas (Branching ratio) dos fragmentos de massa/carga 1 e 88 u.m.a. ....   | 46 |
| Figura 5.8 – Fracções aniónicas (Branching ratio) dos fragmentos de massa/carga 13,14, 16, 17, 17.5 e 48 u.m.a. ....   | 47 |
| Figura 5.9 – Fracções aniónicas (Branching ratio) do fragmento de massa/carga 26 u.m.a. ....   | 48 |
| Figura 6.1 – Espectro para a alanina a 20 eV, antes e depois de subtrair a linha de base. ....   | 55 |

# Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 5.1 – Valores de energia no centro de massa e energia disponível em função da tensão de aceleração aplicada á fonte de potássio iónico. ....  | 31 |
| Tabela 5.2 – Parâmetros experimentais para colisões com alanina a 15, 30 e 100 eV.....   | 32 |
| Tabela 5.3 – Parâmetros experimentais para colisões com valina a 15, 30 e 100 eV. ....   | 33 |
| Tabela 5.4 – Comparação de fragmentos aniónicos observados através de colisões potássio-alanina numa gama de energias dos 15 aos 100 eV com trabalhos anteriores de CED. Letras referentes às Figuras 5.1, 5.2 e 5.3. .... | 38 |
| Tabela 5.5 – Comparação de fragmentos aniónicos observados através de colisões potássio-valina numa gama de energias dos 15 aos 100 eV com trabalhos anteriores de CED. Letras referentes às Figuras 5.4, 5.5 e 5.6. ....  | 39 |





## Simbologia e notações

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| ADN                             | Ácido desoxirribonucleico   |
| ARN                             | Ácido ribonucleico  |
| ATP                             | Adenosina trifosfato  |
| AE                              | Afinidade electrónica   |
| AE <sub>v</sub>                 | Afinidade electrónica vertical  |
| <i>b</i>                        | Parâmetro de impacto  |
| BCAA                            | Aminoácidos de cadeia ramificada ("Branched-chain amino acid")              |
| CE                              | Captura electrónica   |
| CED                             | Captura electrónica dissociativa  |
| DSB                             | quebra dupla de cadeia ("Double Strand Break")                              |
| e <sup>-</sup>                  | Electrão  |
| EI                              | Energia de ionização  |
| <i>h</i>                        | Constante de Planck, 6.626x10 <sup>-34</sup> J·s <sup>-1</sup>              |
| $\hbar$                         | Constante de Planck reduzida, 6.6×10 <sup>-16</sup> eV·s ( $\hbar/2\pi$ )   |
| K <sup>+</sup> <sub>Hyper</sub> | Ião de potássio hipertérmico  |
| K <sup>+</sup> <sub>Ther</sub>  | Ião de potássio térmico   |
| K <sup>0</sup> <sub>Hyper</sub> | Átomo de potássio hipertérmico  |
| K <sup>0</sup> <sub>Ther</sub>  | Átomo de potássio térmico   |
| <i>p</i>                        | Probabilidade de Landau-Zener   |
| q                               | Unidade de carga elementar, 1.602x10 <sup>-19</sup> C                       |
| R <sub>c</sub>                  | Raio de cruzamento  |
| R <sub>m</sub>                  | Distância entre átomo alcalino projectil e centro de massa da molécula alvo |
| SSB                             | quebra simples de cadeia ("Single Strand Break")                            |
| TE                              | Transferência de electrão   |
| TNI                             | Ião temporário negativo ("Temporary Negative Ion")                          |
| TOF                             | Tempo de voo, espectrómetro ("Time Of Flight")                              |
| u.m.a.                          | Unidade de massa atómica, 1.66×10 <sup>-27</sup> Kg                         |
| v*                              | Velocidade reduzida   |
| v <sub>r</sub>                  | Velocidade radial   |
| Γ                               | Largura (em energia) da ressonância   |
| ΔE                              | Endoergicidade  |
| λ                               | Livre percurso médio  |
| σ                               | Secção eficaz   |
| τ                               | Tempo de vida   |



# Capítulo 1 Introdução

## 1.1. Objectivo

A principal motivação desta dissertação de mestrado debruça-se sobre o estudo dos processos de transferência de electrão em aminoácidos de cadeia alifática, nomeadamente alanina ( $C_3H_7NO_2$ ) e valina ( $C_5H_{11}NO_2$ ), utilizando a técnica de feixes moleculares cruzados, com o objectivo de identificar os mecanismos de fragmentação que tornam os electrões um dos principais agentes de degradação a nível molecular das proteínas e do meio biológico que as rodeia. O processo consiste numa colisão átomo-molécula em que o electrão é transferido de um átomo dador para um alvo molecular, sendo posteriormente detectados os fragmentos aniónicos resultantes através de um espectrómetro de massa do tipo tempo de voo.

## 1.2. Enquadramento

No decorrer dos últimos anos, a comunidade científica tem demonstrado um interesse particular pela investigação dos processos capazes de danificar e causar mutação em tecido biológico, principalmente quando estes conduzem ao desenvolvimento de patologias. É largamente aceite na comunidade científica internacional que a radiação ionizante ( raios-X, raios  $\gamma$ , iões, prótons e electrões) é capaz de activar mecanismos durante os primeiros instantes da irradiação ( $\sim 10^{-16}$  segundos após interacção) que com o passar do tempo podem resultar em dano celular. Os efeitos, directos e indirectos, de tal radiação são amplamente reconhecidos como sendo os principais responsáveis pelas alterações tanto de estrutura como de funcionalidade a nível celular. Estas alterações podem causar mutações génicas, perda de funcionalidade celular, desenvolvimento de doenças oncológicas e morte celular.

Devido à sua eficácia em danificar o ADN, a radiação ionizante é usada em tratamentos de radioterapia com o objectivo de destruir células cancerígenas. A desvantagem deste processo está no dano infligido às células saudáveis adjacentes ao tecido cancerígeno. De forma a aumentar a eficácia do processo e diminuir os danos a células saudáveis, é necessário compreender a interacção da radiação ionizante com o tecido biológico não só pelos efeitos macroscópicos da dose de radiação aplicada mas também pelos mecanismos moleculares que precedem o dano celular.

A Figura 1.1 ilustra os diferentes estágios do dano no ADN pela radiação ionizante e a correspondente escala temporal em que cada estágio ocorre. Instantes após a irradiação do material biológico ( $10^{-16}$  segundos), têm lugar os processos físicos, que são seguidos pelos processos físico-químicos, químicos e bioquímicos até chegar aos processos biológicos. Para melhor compreender determinados efeitos biológicos é necessário primeiro compreender os processos que estão na génese desta cadeia de eventos, os processos físicos e físico-químicos. Se conseguirmos compreender estes

processos a nível molecular poderá ser possível detectar e evitar patologias associadas à radiação ionizante ou mesmo ser possível efectuar manipulação molecular.

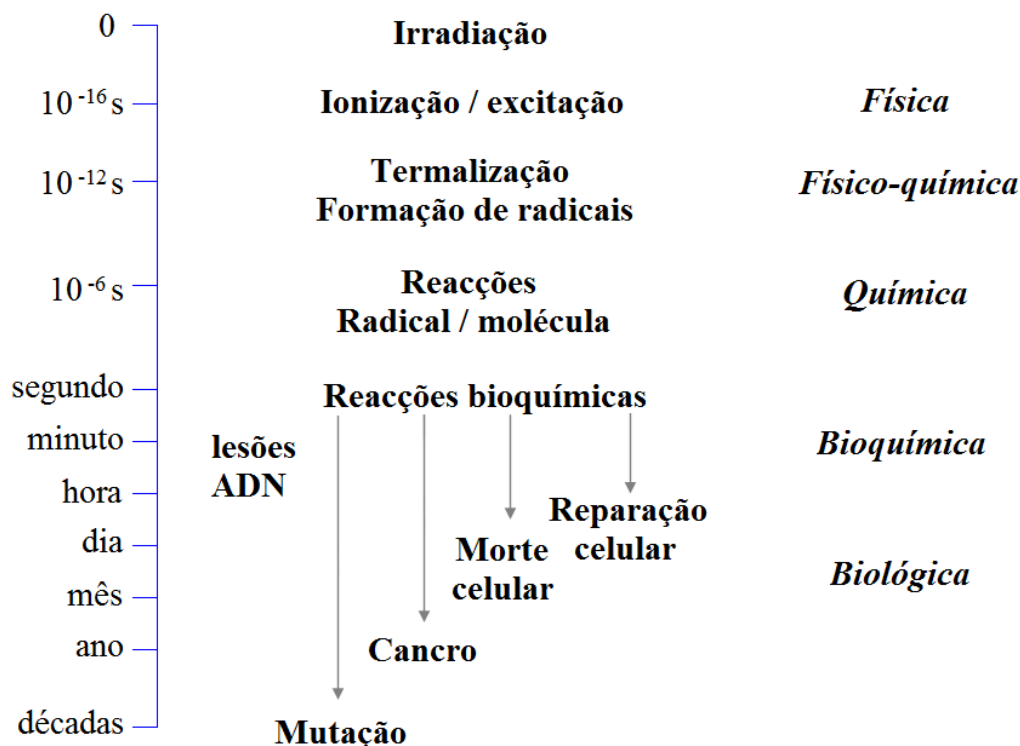


Figura 1.1 – Diagrama temporal dos vários estágios da irradiação.

Ao longo dos anos têm sido realizados estudos para compreender os efeitos, directos e indirectos da radiação ionizante nos tecidos biológicos. Sabe-se hoje que, ao longo do seu percurso no tecido biológico, a radiação ionizante origina espécies secundárias (iões, radicais e electrões de baixa energia ou balísticos) que produzem efeitos mais graves do que a radiação primária que lhes deu origem. Destas espécies secundárias, as mais abundantes são electrões de baixa energia, sendo produzidos aproximadamente  $5 \times 10^4$  por cada MeV de radiação incidente com energias tipicamente inferiores a 20 eV<sup>[1]</sup>. De acordo com a literatura, cerca de 1/3 do dano celular causado provém de energia depositada no ADN e nas moléculas de água que lhe estão próximas e os restantes 2/3 resultam de processos indirectos causados pelos electrões e radicais formados e pela decomposição de moléculas próximas do ADN<sup>[2][3][4]</sup>. Este trabalho está focado em alguns dos processos indirectos, em especial os que envolvem transferência de electrão.

Estudos realizados por Boudaïfa *et al.*<sup>[1]</sup> mostraram que não só os fotões mas também os electrões com energias abaixo do limiar de ionização (entre 7.5 e 10 eV), ou seja, radiação não ionizante, podem promover danos nas cadeias de ADN, originando quebras simples (SSB) e duplas da cadeia de ADN (DSB)<sup>[1][5]</sup>.

A capacidade de dano dos electrões secundários não está limitada à molécula de ADN, sendo também capaz de danificar outras estruturas no meio celular, nomeadamente proteínas<sup>[6]</sup>. Em meio celular, o ADN está associado a proteínas tal como as histonas e outras proteínas cromossómicas. Está também ligado a factores de transcrição, proteínas específicas que se ligam a determinados genes, de

forma a regular a sua expressão<sup>[7]</sup>. Devido à relativa complexidade das proteínas, a pesquisa científica focou-se no estudo das suas unidades básicas, os aminoácidos<sup>[6]</sup>. Estes estudos procuram compreender a fragmentação destas biomoléculas através de processos de captura electrónica dissociativa (CED), em que é feito incidir nos aminoácidos electrões de baixa energia. Esta abordagem, apesar de válida do ponto de vista biológico, é limitada pelo curto tempo de vida dos electrões em meio biológico, sendo assim insuficiente para explicar a fragmentação destas biomoléculas<sup>[7]</sup>. Para melhor simular as condições do meio celular, neste trabalho utilizamos electrões não livres que são transferidos aos aminoácidos de cadeia alifática em estudo por um átomo dador, o potássio. Estes electrões ao serem transferidos para os aminoácidos em estudo vão formar um ião negativo temporário (TNI) cuja fragmentação dá origem a espécies aniónicas e neutras. Ao fragmentar as unidades básicas das proteínas, estas podem perder parcial ou totalmente as suas funcionalidades, podendo, no caso das proteínas associadas ao ADN afectar a expressão génica e a resposta da célula a estímulos exteriores<sup>[8]</sup>. Por outro lado, os fragmentos aniónicos e neutros (entre os quais se encontram radicais livres como  $H\bullet$ ,  $O\bullet$  e  $OH\bullet$ , estes últimos bastante reactivos) ao serem formados próximos do ADN podem interagir com este e causar quebras na cadeia<sup>[7][9]</sup>. Apesar de a técnica utilizada neste estudo só detectar iões negativos, a formação destes implica a formação de espécies radicalares neutras e portanto devem ser consideradas na avaliação do dano total causado pela fragmentação das moléculas em estudo. É portanto evidente que a compreensão dos processos físicos e físico-químicos que ocorrem nos constituintes do meio celular, particularmente os que são próximos ao ADN são de elevada importância no entendimento da extensão dos danos provocados pela deposição de energia através de radiação. Como já foi referido, esta compreensão permitirá melhorar a eficácia da terapia radiativa no tratamento de patologias oncológicas e lança as bases para o desenvolvimento de novas técnicas, em especial a nanoradioterapia.

### 1.3. Estrutura

Esta dissertação de mestrado está dividida em seis capítulos. No Capítulo 1 foi apresentado o objectivo deste trabalho e o seu enquadramento. No Capítulo 2 faz-se uma descrição sucinta dos processos de dissociação molecular, dos conceitos e mecanismos que se pretendem estudar com o aparelho de feixes moleculares cruzados. No Capítulo 3 faz-se uma introdução aos aminoácidos de cadeia alifática em estudo, alanina e valina e a apresentação dos estudos presentes na literatura sobre estes. No Capítulo 4 é descrita a montagem experimental e funcionamento do aparelho de feixes moleculares cruzados utilizado para fazer as medições desta dissertação. No Capítulo 5 são apresentados os resultados obtidos e a análise efectuada para as moléculas em estudo. Por último, no Capítulo 6 são descritas as conclusões do trabalho efectuado e sugestões de trabalho futuro.



## Capítulo 2 Processos de Dissociação Molecular

Os mecanismos de dissociação molecular podem ser desencadeados por processos que envolvem um electrão adicional. Se considerarmos A um átomo e BC uma molécula, o mecanismo de captura electrónica pode ser representado por:



Por sua vez, o mecanismo de transferência de electrão pode ser representado por:



### 2.1. Captura electrónica (CE)

No mecanismo de captura de electrões livres é criado um ião temporário negativo (TNI). Dependendo do tempo de vida do TNI relativamente à auto-libertação electrónica, este pode decair para fragmentos aniónicos e fragmentos neutros<sup>[10]</sup>. Este fenómeno pode ser dividido em duas classes, sendo elas a dispersão directa e a dispersão ressonante. Na dispersão directa o electrão incidente interage (colide) com a molécula alvo e é eventualmente desviado da sua trajectória original. Na dispersão ressonante o electrão incidente fica retido por um período de tempo significativamente longo (entre  $10^{-12}$ s a  $10^{-13}$ s) na vizinhança da molécula, formando um TNI. A captura electrónica só ocorre se a energia do electrão incidente for a mesma do estado electrónico do TNI. O tempo de vida de um TNI está sujeito a grandes variações, estando dependente da energia de ressonância e da dimensão espacial da molécula, variando desde alguns períodos vibracionais ( $10^{-14}$ s) até alguns microssegundos no caso de moléculas poliatómicas. De acordo com o principio de incerteza de Heisenberg, o tempo de vida de um TNI está relacionado com a largura de energia e é dado por<sup>[11]</sup>:

$$\tau \approx \frac{\hbar}{\Gamma} \quad (2.4)$$

Com  $\hbar = h/2\pi = 6.6 \times 10^{-16} \text{ eV} \cdot \text{s}$ . Após a criação do TNI este pode decair por 3 processos diferentes:



Onde (2.5) é designado auto-libertação electrónica, (2.6) estabilização radiativa e (2.7) captura electrónica dissociativa (CED). O símbolo "\*" significa que o anião ou a molécula se encontram num estado electrónico excitado.

Em reacções do tipo (2.5), a molécula não sofre qualquer tipo de dissociação, voltando a ficar neutra após emitir o electrão em excesso. No entanto, devido ao tempo de permanência deste, a molécula pode ficar num estado vibracional excitado. Em reacções do tipo (2.6), o electrão fica ligado à molécula mas o excesso de energia interna do sistema causa a emissão de um fóton com energia igual ao excesso. Os tempos de vida radiativos são da ordem dos  $10^{-9}$  a  $10^{-8}$  s o que faz com que estas reacções sejam mais lentas comparativamente com as reacções (2.5) e (2.7), o que implica a não competitividade deste processo com os restantes. Em último, a captura electrónica dissociativa (CED), processo (2.7), possui tempos de reacção de ordem  $10^{-14}$  a  $10^{-12}$  s. A decomposição do TNI ocorre não só pela instabilidade provocada pela presença temporária de um electrão extra que altera o potencial intramolecular como também pelo excesso de energia interna, o que faz com que o TNI passe para um estado excitado. Este processo é selectivo quanto à ligação química (*bond selective*) e quanto à localização na estrutura molecular (*site selective*), uma vez que depende da ligação e da posição do grupo ou átomo onde o electrão interacciona com a molécula<sup>[11]</sup>.

As energias para as quais os electrões de baixa energia têm capacidade de induzir danos ao nível do ADN coincidem com as energias às quais a CED produz dissociação molecular em bases de ADN. Se o canal de CED estiver acessível, este vai competir fortemente com o processo de auto-libertação electrónica e os electrões de baixa energia produzidos pela radiação primária (e.g. raios-X,  $\beta$ , partículas  $\alpha$ ) podem induzir CED em locais específicos da dupla hélice do DNA, formando TNIs que ao decaírem produzem iões estáveis e espécies radicalares com potencial de danificar a hélice do ADN<sup>[1][12]</sup>.

Como nem todos os processos colisionais que ocorrem no ADN são explicados por CED torna-se relevante considerar outros processos, como é o caso da transferência de electrões.

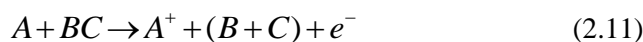
## 2.2. Transferência de electrões (TE)

Como já foi referido anteriormente, os electrões livres têm tempos de vida muito curtos em meio biológico, e portanto o seu impacto é limitado e não é suficiente como modelo explicativo dos fenómenos de degradação do ADN. Torna-se assim relevante estudar o processo de transferência de electrão (TE), pois este permite descrever o tipo de interacção de forma mais próxima à realidade do meio biológico, uma vez que faz uso de electrões que se encontram previamente ligados a estruturas atómicas e moleculares já presentes no meio celular. Através desta técnica é também possível aceder a estados electrónicos inacessíveis por outros processos, uma vez que através de colisões átomo-molécula é possível aceder a estados com electroafinidades positivas, o que não é possível em CED.

Os processos de ionização colisional incluem todas as interacções entre partículas neutras em que se verifica um processo de transferência de electrão. As expressões (2.8) a (2.16) descrevem os diferentes tipos de processos de transferência de electrão observados entre átomos e moléculas no seu estado fundamental. Estes processos são a ionização não dissociativa (2.8 e 2.9), a ionização



dissociativa (2.10), a ionização do "projectil" (2.11), a ionização química reactiva (2.12, 2.13 e 2.14), a ionização química associativa (2.15) e a dissociação polar induzida por colisão (2.16).



Uma maneira de induzir transferência de electrão é usar um átomo dador de electrões, átomo este que devido à sua estrutura electrónica tenha grandes probabilidades de transferir o seu electrão de valência para a molécula alvo. Os metais alcalinos (K, Na, Cs ...) são bons exemplos de átomos dadores.

Como já foi referido anteriormente, no âmbito deste trabalho o átomo dador utilizado é o potássio (K). O potássio é um metal alcalino com uma energia de ionização relativamente baixa<sup>[13]</sup> (4.34 eV), o que significa que o potássio pode ser considerado como um bom dador de electrões.

A capacidade de um átomo ou molécula formar termodinamicamente um TNI estável é representada pela Afinidade Electrónica (AE), de acordo com a seguinte equação:

$$AE(BC) = E(BC) - E(BC^-) \quad (2.17)$$

A AE é definida pela diferença entre a energia do estado fundamental de um átomo ou molécula neutra e o estado fundamental do seu anião. A AE é negativa se o estado iónico estiver acima do estado neutro, e positiva se o estado iónico estiver abaixo do estado neutro. Daqui se conclui que um valor positivo da AE é um indicador da provável formação de um anião estável.

### 2.3. Mecanismo "Harpoon"

O mecanismo "harpoon" aplica-se apenas a interacções entre átomos (ou moléculas) com um potencial de ionização muito baixo e moléculas com uma afinidade electrónica muito alta. Este mecanismo foi proposto por Michael Polanyi em 1932 para explicar as grandes secções eficazes ( $\sigma > 100 \text{ \AA}^2$ ) obtidas através da colisão entre átomos alcalinos e moléculas halogéneas em contraste com o valor tipicamente obtido pelos parâmetros moleculares<sup>[14]</sup>:

$$\sigma \approx \pi R_c^2 \quad (2.18)$$

Para explicar este processo vamos considerar a colisão entre K e Br<sub>2</sub>. Num primeiro passo da interacção o electrão de valência do potássio é transferido para a molécula de halogénio. De seguida é formado um par de iões temporário (K<sup>+</sup>Br<sub>2</sub><sup>-</sup> por exemplo). A força de Coulomb fortemente atractiva leva a que os dois iões se juntem, formando KBr estável e rejeitando um átomo de Br. Assim, o átomo alcalino utilizou o seu electrão como um "arpão" de modo a puxar a molécula de halogénio, sendo esta a razão do nome mecanismo de *harpoon*. Este mecanismo está esquematizado na Figura 2.1.

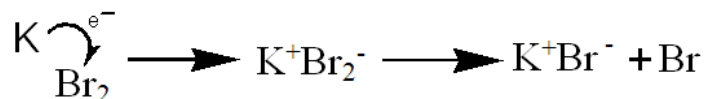


Figura 2.1 - Esquema sequencial do mecanismo de harpoon<sup>[15]</sup>.

Na Figura 2.2 está esquematizada a intersecção das curvas potenciais de modo a modelar o mecanismo *harpoon* do K + Br<sub>2</sub>. A curva quase plana representa o intervalo de interacção K-Br<sub>2</sub>, onde ambos os intervenientes estão neutros. Parte da curva (2) corresponde a um potencial meramente de Coulomb que se aproxima do potencial iónico de K<sup>+</sup>-Br<sub>2</sub><sup>-</sup>. Ao diminuir a distância R até ao ponto de cruzamento R<sub>c</sub>, o estado de energia mais baixo do sistema (K-Br<sub>2</sub>) troca, passando do estado covalente para o estado iónico e segue a curva (2), de menor energia, até K<sup>+</sup>-Br<sub>2</sub><sup>-</sup>. Devido à elevada atracção de Coulomb, a reacção ocorre "imediatamente" após a transferência do electrão<sup>[14]</sup>.

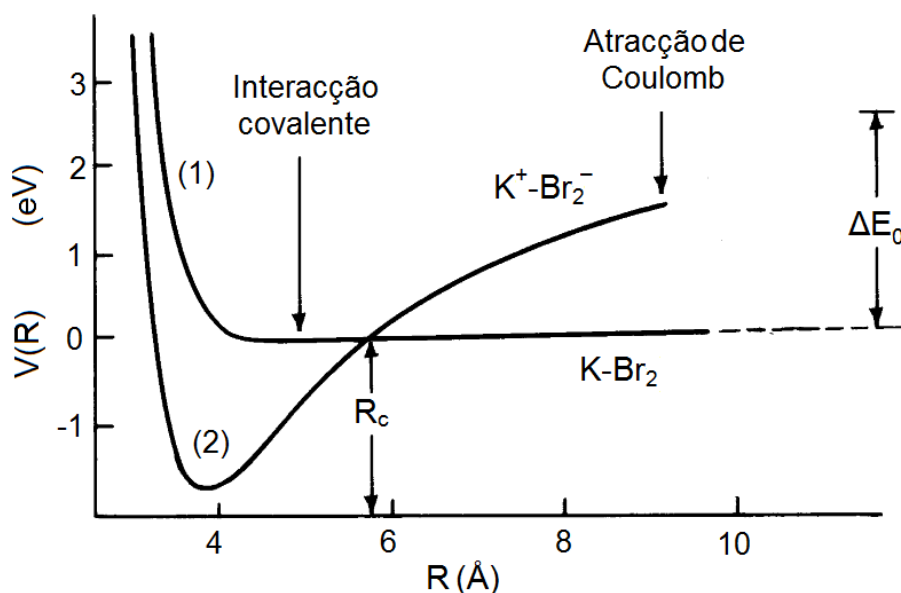


Figura 2.2 – Representação esquemática da intersecção das curvas potenciais do K-Br<sub>2</sub> e K<sup>+</sup>-Br<sub>2</sub><sup>-</sup> no ponto de cruzamento R<sub>c</sub>. Adaptado da referência<sup>[14]</sup>.

Considerando como parâmetro de impacto  $b$ , para  $b > R_c$  as duas espécies nunca vão ficar "suficientemente próximas" de modo a que ocorra transferência de electrão uma vez que o potencial de Coulomb sentido é muito fraco. Quando  $b < R_c$  a transferência de electrão pode ocorrer pois a forte atracção de Coulomb supera a repulsão centrífuga e existe formação de pares de iões. O modelo de

*harpoon* permite assim uma compreensão do mecanismo das reacções de ionização química que ocorrem numa colisão ( $K + BC \rightarrow K^+ + BC^-$  por exemplo).

## 2.4. Teoria de colisão e formação de pares de iões

### 2.4.1. Considerações sobre o modelo e tempo de colisão

Neste modelo considera-se que a rotação e a vibração da molécula não são relevantes, sendo assim possível aproximar-se a um sistema de colisão átomo-átomo. Em primeira aproximação esta consideração é válida pois os tempos de rotação e colisão podem ser muito inferiores em relação ao tempo de colisão. Assim a molécula é considerada como um objecto rígido e o movimento interno da molécula ou do ião molecular é considerado independente do movimento do átomo alcalino durante o processo de colisão. O estudo do tempo de colisão é de grande importância para a análise de sistemas com transições vibracionais durante a respectiva colisão, estando dependente das energias envolvidas no processo. Quanto maior a energia menor será o tempo de colisão<sup>[16]</sup>.

### 2.4.2. Formalismo de Landau-Zener e probabilidade de transição não adiabática de Landau-Zener

Para colisões entre átomos alcalinos e moléculas halogenadas a secção eficaz total relativa à formação de pares de iões na região das altas velocidades pode ser avaliada pelo formalismo de Landau-Zener. Este formalismo foi apresentado por Landau e Zener numa perspectiva muito geral de encontrar uma probabilidade de transição não adiabática entre dois estados de energia. A fórmula de Landau-Zener é uma solução analítica para as equações de movimento que regem a dinâmica de transição de um sistema de mecânica quântica composto por duas partículas, com um Hamiltoniano dependente do tempo<sup>[16]</sup>.

De acordo com a descrição do modelo a dois estados, iónico e covalente, a transição entre eles é possível se ocorrer de forma adiabática, ou seja, se as partículas se aproximarem lentamente. Nesta situação os electrões têm tempo suficiente para, de uma forma continuada, se ajustarem à variação da separação internuclear que ocorre durante uma colisão. Este ajuste dá origem a uma transição do electrão de valência do átomo alcalino para a molécula alvo. Por outro lado, se a distância internuclear variar rapidamente, numa perspectiva não adiabática, o electrão de valência tem uma probabilidade de não transitar. Neste caso o sistema não se altera e mantém a sua configuração electrónica. Existem dois pontos de cruzamento, o primeiro é atingido na aproximação do potássio à molécula e o segundo quando este se afasta da molécula.

A transferência de electrão em colisões átomo-molécula é geralmente mediada pelo cruzamento das superfícies de energia potencial do complexo neutro ( $A+B$ ) e iónico ( $A^++B^-$ ). Para grandes distâncias entre átomo e molécula, a curva de energia potencial iónica está acima da covalente, como podemos observar na Figura 2.3.

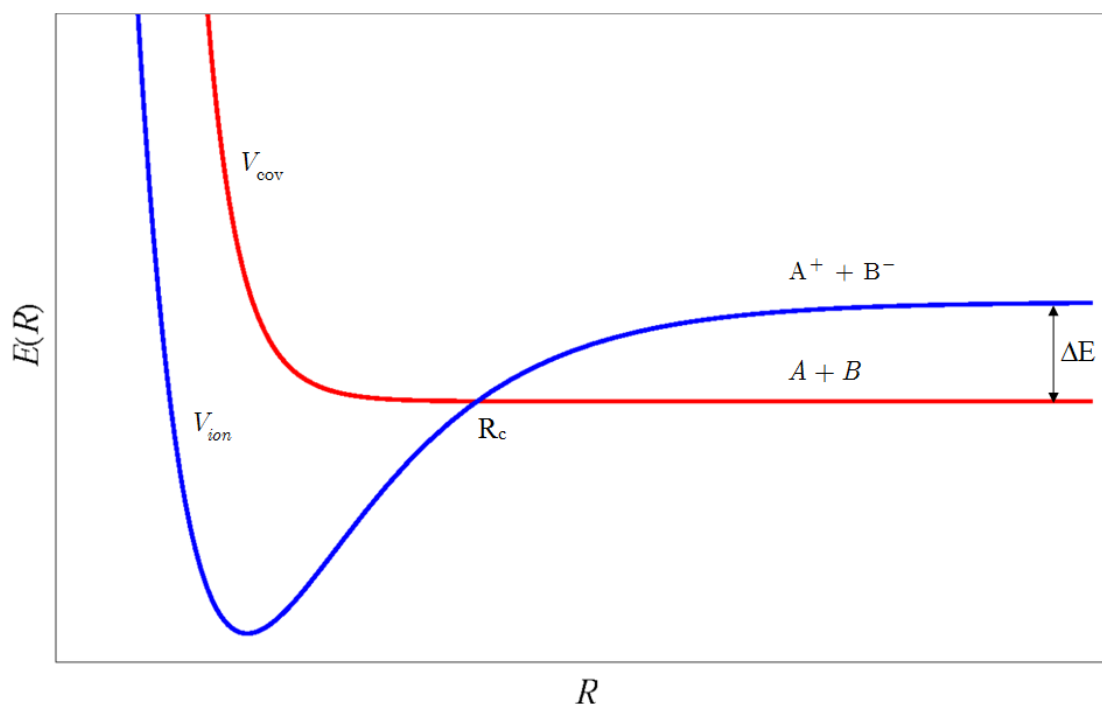


Figura 2.3 – Representação esquemática de curvas não adiabáticas, iónica e covalente, representando a colisão entre dois átomos consoante a distância internuclear<sup>[17]</sup>.

De acordo com Kley<sup>[18]</sup>, no complexo de colisão  $[A^+B^-]^*$  existe um ponto de cruzamento em que ambas as curvas tomam o mesmo valor devido ao potencial que é maioritariamente de Coulomb. Esta interacção leva à formação de um ião positivo e um anião molecular, o que permite o acesso a estados moleculares que não são acessíveis por CED. Durante o processo de criação de iões negativos moleculares, a distância internuclear de equilíbrio é em geral sempre superior à distância de equilíbrio da molécula neutra. Este fenómeno deve-se à captura de um electrão extra, o que vai enfraquecer a energia de ligação. Numa colisão, quando ocorre a transferência do electrão de valência do átomo alcalino para a molécula, o ião negativo é formado numa zona repulsiva do potencial. Consequentemente, durante a colisão, pode ocorrer uma variação da distância intramolecular, fenómeno a que chamamos extensão da ligação (*bond-stretching*). Devido a isto, a afinidade electrónica em relação ao centro de massa da molécula,  $AE(R_m)$ , onde  $R_m$  é definido como a distância entre o átomo alcalino projectil e o centro de massa da molécula, aumenta com a expansão da distância de cruzamento,  $R_c$ .

Numa colisão átomo-átomo, a equação (2.19) descreve a dependência da afinidade electrónica com  $R_m$  e explica o consequente acréscimo da distância de cruzamento<sup>[16]</sup>:

$$R_c (\text{\AA}) \approx \frac{e^2}{\Delta E} = \frac{14.41}{EI - AE(R_m)} \quad (2.19)$$

Se considerarmos que a transição que ocorre a  $R_c$ , onde a velocidade radial,  $v_r$ , é constante (trajectória rectilínea) e igual para os dois estados electrónicos, então a probabilidade de transição não

adiabática de Landau-Zener,  $p$ , é determinada por<sup>[16]</sup>:

$$p = \exp\left(-\frac{v^*}{v_r}\right) = \exp\left[-\frac{v^*}{v_r}\left(1 - \frac{b^2}{R_c^2}\right)^{-1/2}\right] \quad (2.20)$$

Em que  $b$  é o parâmetro de impacto e  $v^*$  é a velocidade reduzida.

A Figura 2.4 ilustra as quatro trajectórias possíveis durante uma colisão. Consideremos  $p$  a probabilidade de em cada cruzamento ocorrer uma transição não adiabática e  $(1-p)$  a probabilidade de se continuar na mesma curva de potencial adiabática. Em duas destas trajectórias, se em ambos os cruzamentos as transições forem do mesmo tipo, isto é, duas transições adiabáticas ou duas transições não adiabáticas, então a colisão dá origem a uma dispersão elástica. Nas restantes duas trajectórias, em que uma das transições é adiabática e a outra não adiabática, tendo uma delas probabilidade  $p(1-p)$  e a outra  $(1-p)p$ , ocorre a formação de pares de iões.

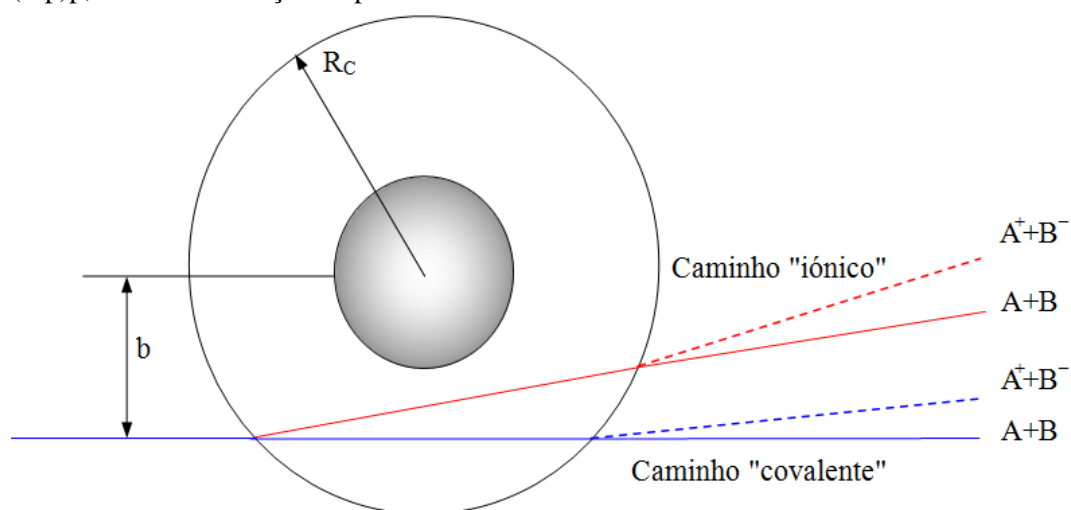


Figura 2.4 – Representação das quatro trajectórias possíveis numa colisão entre um átomo alcalino e uma molécula. O círculo interior corresponde à região repulsiva dos potenciais<sup>[17]</sup>.

Assim, a probabilidade total de criação de pares de iões numa colisão, assumindo que a probabilidade  $p$  não varia entre o primeiro e o segundo cruzamento, é<sup>[16]</sup>:

$$P = p(1-p) + (1-p)p = 2p(1-p) \quad (2.21)$$

O estudo de colisões entre átomos e moléculas neutras com formação de pares de iões é de extrema importância pois permite o estudo da formação dos iões negativos através da transferência de electrão. Numa tentativa de descrever os processos a nível molecular e de aproximação aos processos que ocorrem no meio biológico mediados por electrões, é útil estudar este tipo de mecanismos, pois permitem simular os processos de transferência de electrão que levam à degradação de moléculas biológicas.

### 2.4.3. Aproximação de Born-Oppenheimer

A equação de Schrödinger não tem soluções exactas para sistemas moleculares poliatômicos. A aproximação de Born-Oppenheimer, estabelece que os núcleos estão fixos em relação aos electrões. Esta teoria tem por base o facto de os núcleos serem muito mais pesados que os electrões. Assim, o movimento electrónico pode ser tratado separadamente do movimento nuclear e consequentemente podemos resolver a equação de Schrödinger onde os valores próprios são considerados potenciais intermoleculares (para 2 corpos) e superfícies de energia potencial (para 3 ou mais corpos) que por sua vez determinam o movimento nuclear<sup>[16]</sup>.

A Figura 2.5 ilustra os potenciais intermoleculares para a estrutura neutra e aniónica de uma molécula diatómica genérica AB. Pode considerar-se  $AE(AB)$  como sendo a afinidade electrónica adiabática. A afinidade electrónica vertical ( $AE_v$ ) vai variar conforme a extensão da ligação A-B durante a transferência do electrão. A diferença entre as duas é que na afinidade electrónica adiabática a transição faz-se entre  $v'=0 \leftarrow v''=0$  enquanto que na afinidade electrónica vertical se faz entre  $v'=v(v \neq 0) \leftarrow v''=0$ . Para o caso em que a distância A-B é a distância de equilíbrio, a  $AE_v$  será ligeiramente positiva.

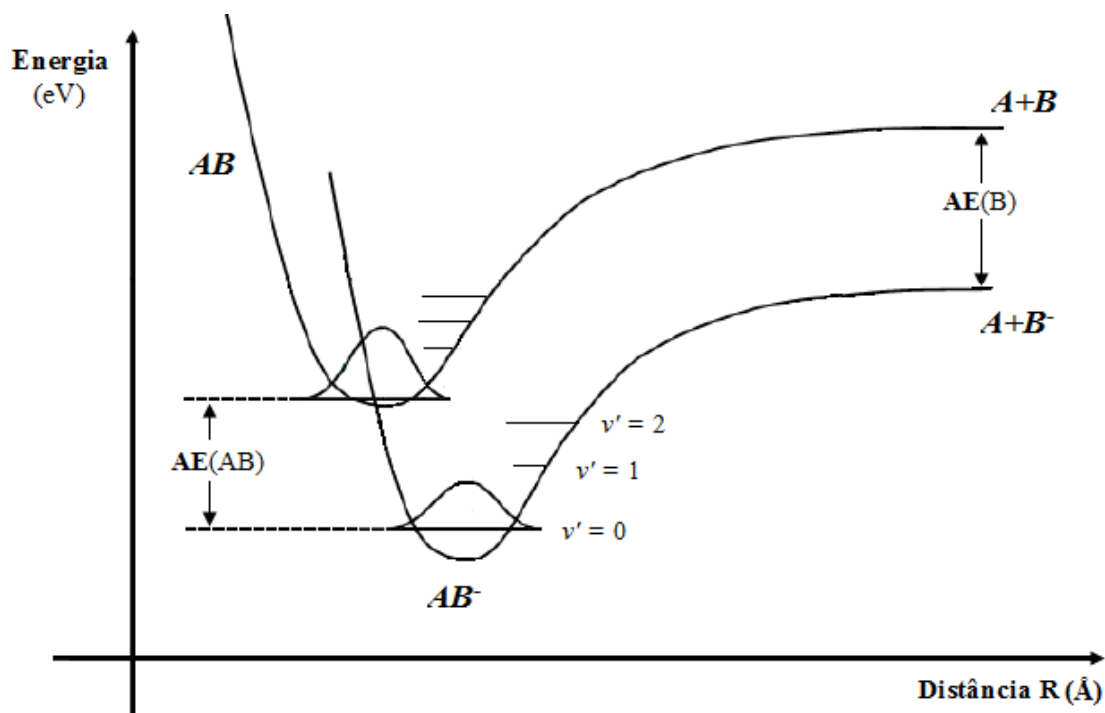


Figura 2.5 – Curvas de energias potenciais de Born-Oppenheimer, ilustrando a afinidade electrónica adiabática  $AE(AB)$ <sup>[15]</sup>.

### 2.4.4. Colisão átomo-átomo

Quando dois átomos no seu estado fundamental colidem podem ocorrer dois processos. Um deles é denominado dispersão elástica, onde após a colisão ambos os átomos permanecem no seu estado fundamental, mantendo-se os dois neutros e a energia cinética total do sistema é conservada. O

outro denomina-se dispersão inelástica, no qual existe troca de carga entre os átomos durante a colisão e assim estes passam para o estado iónico, sem que haja conservação de energia cinética. Este último é de extrema relevância para este trabalho pois permite a formação de iões negativos através de transferência de electrão<sup>[17]</sup>.

Para caracterizar o processo de transferência de electrão numa colisão átomo-átomo (2.22) podemos simular a colisão entre um átomo alcalino e um átomo do grupo VII da tabela periódica, os halogénios.



As curvas de potencial dos estados não adiabáticos covalente ( $A + B$ ) e iónico ( $A^+ + B^-$ ) estão representadas esquematicamente na Figura 2.6. O ponto de cruzamento das curvas não adiabáticas é  $R_c$ . Considerando a mesma simetria para ambos os estados, as curvas de potencial adiabáticas correspondentes vão evitar o ponto de cruzamento  $R_c$ , devido ao princípio de exclusão de Pauli.

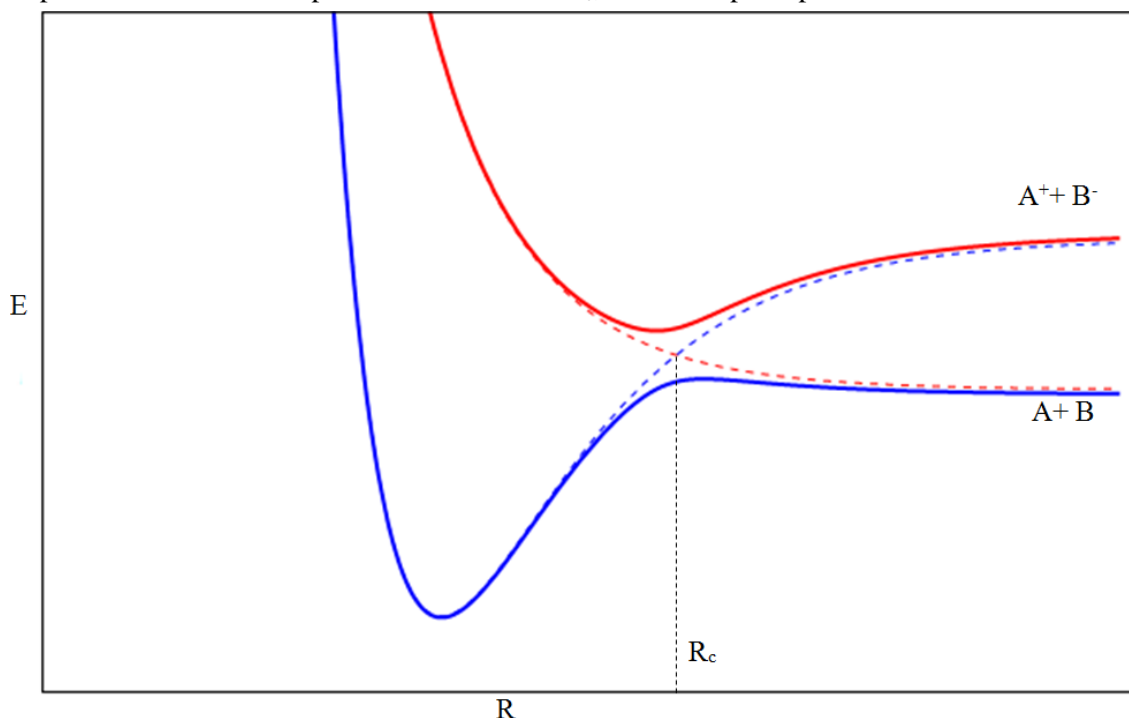


Figura 2.6 – Representação esquemática da evolução dos estados adiabáticos dependendo da distância internuclear<sup>[17]</sup>. A curva azul corresponde ao estado adiabático covalente e a vermelha ao estado adiabático iónico. As curvas a tracejado representam os estados não adiabáticos covalente (vermelho) e iónico (azul).

Estas curvas representam a distância entre as duas partículas (o átomo dador e átomo aceitador) e os seus estados correspondentes. Começando pela direita da figura, podemos simular a aproximação do átomo dador ao átomo aceitador pela curva azul até atingir o primeiro ponto de cruzamento. O segundo ponto de cruzamento é simulado observando a figura da esquerda para a direita.

Para grandes distâncias entre os dois átomos, a separação entre o potencial covalente e o potencial iónico, é dado pela endoergicidade,  $\Delta E$  (diferença entre a energia de ionização de um átomo

e a electroafinidade do outro). Se considerarmos que o ponto de cruzamento está localizado a grandes distâncias internucleares, podemos desprezar as forças de indução e as forças de Van der Waals e considerar que o potencial covalente é nulo e o potencial iónico é puramente de Coulomb.

#### 2.4.5. Colisão átomo-molécula

Em comparação com as colisões átomo-átomo no estado fundamental, as colisões átomo-molécula nas mesmas condições implicam uma análise com maior complexidade devido ao aumento de complexidade estrutural por parte do alvo, a molécula. Este aumento de complexidade inclui a consideração adicional de processos como a excitação rotacional, excitação vibracional, dissociação induzida por colisão, excitação electrónica ou a combinação de todos estes.

A descrição das colisões átomo-molécula é interpretada por curvas de potencial multidimensionais, ao contrário das curvas de potencial de uma dimensão utilizadas para as colisões átomo-átomo. Nesta interpretação deve ter-se em conta os tempos associados a movimentos rotacionais e vibracionais da molécula. O tempo de rotação da própria molécula é um processo relativamente lento comparativamente com o tempo de colisão, razão pela qual se pode desprezar. No entanto, os tempos de vibração podem ter a mesma ordem de grandeza dos tempos de colisão, o que implica a consideração dos efeitos da vibração molecular no referido processo<sup>[17]</sup>.

Várias aproximações foram desenvolvidas com o objectivo de descrever o comportamento dos electrões durante as colisões átomo-molécula inelásticas (processos não adiabáticos), entre eles a perspectiva clássica, onde o movimento do núcleo é descrito desprezando os efeitos de interferência e as probabilidades de transição são calculadas utilizando métodos de mecânica quântica.



## Capítulo 3 Aminoácidos de cadeia alifática

Os aminoácidos são moléculas constituintes das proteínas e como tal fazem parte dos elementos fundamentais do corpo humano. Dos 20 aminoácidos envolvidos na síntese de proteínas no corpo humano só a glicina não possui estereoisómeros, ou seja, a mesma fórmula química só existe numa única configuração. Dos restantes aminoácidos, apesar de ocorrerem na natureza as várias configurações possíveis, só os de configuração L fazem parte da síntese de proteínas<sup>[19]</sup>. Estas moléculas são constituídas por um átomo de carbono ao qual está ligado um átomo de hidrogénio, um grupo amina ( $\text{NH}_2$ ), um grupo carboxila ( $\text{COOH}$ ) e uma cadeia lateral, sendo esta a característica que identifica o aminoácido. Os aminoácidos têm a peculiaridade de formar iões dipolares, também chamados "Zwitteriões". Isto deve-se à deslocação de um protão do grupo carboxila para o grupo amina, sendo este o estado dos aminoácidos em pH 7,4, o valor em meio fisiológico<sup>[19]</sup>. Como se trata apenas de uma deslocação de carga interna a molécula como um todo continua neutra.

No corpo humano os aminoácidos dividem-se em duas classes, aminoácidos essenciais e não essenciais. Os aminoácidos essenciais, como a valina, não são possíveis de sintetizar pelo organismo e como tal têm de ser ingeridos. Pelo contrário, os aminoácidos não essenciais são possíveis de sintetizar pelo organismo, a maior parte obtida a partir de derivados da glicólise ou do ciclo de ácido cítrico, sendo a alanina um desses aminoácidos<sup>[19]</sup>.

Neste trabalho as moléculas em estudo são aminoácidos de cadeia alifática, nomeadamente alanina e valina. Apesar de as cadeias laterais de ambas as moléculas não serem reactivas devido à sua saturação, estes aminoácidos têm um papel muito relevante na manutenção da estrutura tridimensional das proteínas em que se inserem, pois as suas cadeias laterais são hidrofóbicas<sup>[19]</sup>.

### 3.1. Alanina

Na Figura 3.1 é apresentada a estrutura química da alanina, cuja fórmula química é ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ ).

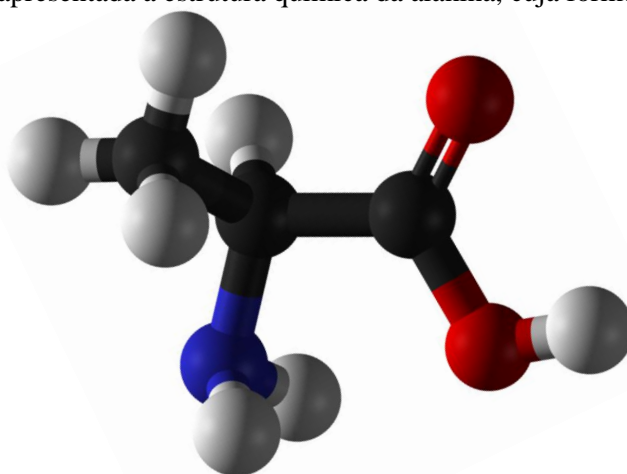


Figura 3.1 – Estrutura química da Alanina. A azul átomo de N, a vermelho átomos de O, a preto átomos de C e a cinzento átomos de H.

Como se pode constatar da Figura 3.1, a cadeia lateral da alanina é constituída por um grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ), fixando a sua massa em 89.09 g/mol.

Como já foi referido anteriormente, a alanina é um aminoácido não essencial e como tal é sintetizado pelo organismo a partir do piruvato, um subproduto da glicólise, através de uma reacção de transaminação<sup>[19]</sup>. No corpo humano é extremamente abundante<sup>[20]</sup>, estando presente em diversas proteínas, incluindo o citocromo *c* e a hemoglobina, sendo o aminoácido presente em maior quantidade nesta última<sup>[19]</sup>. Faz também parte do ciclo de glucose-alanina, representado na Figura 3.2, um processo entre o fígado e o tecido muscular que serve, de forma indirecta, para o tecido muscular eliminar azoto enquanto recupera as suas reservas de energia, na forma de glucose.

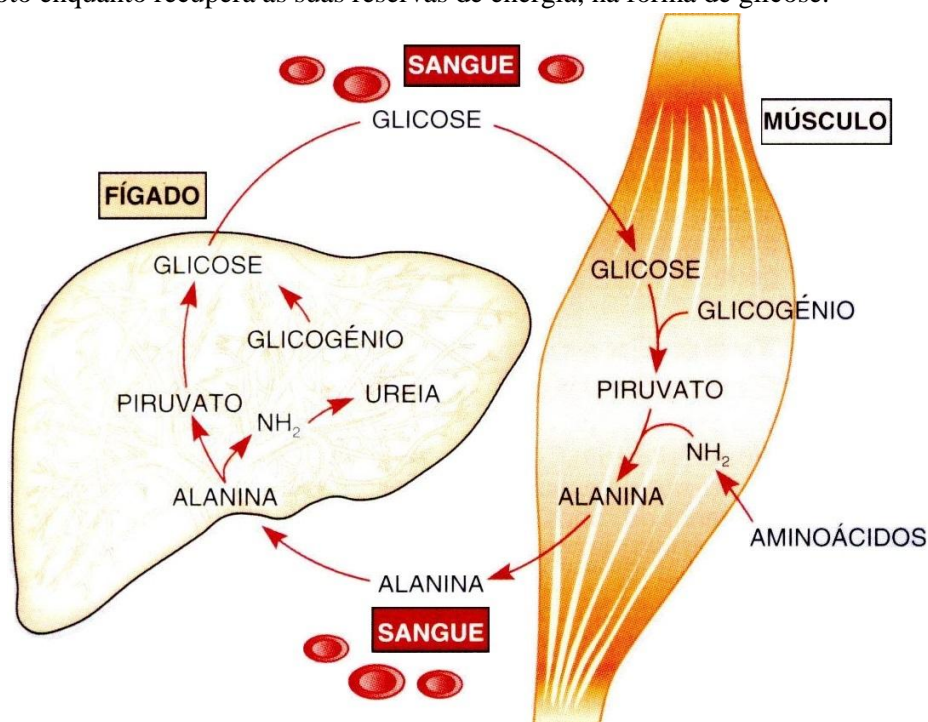


Figura 3.2 – Esquema do ciclo glucose-alanina. Adaptado da referência<sup>[21]</sup>.

A alanina é também usada como um *standard* secundário de dosimetria em espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica para altas doses de energia, devido à formação de radicais estáveis (maioritariamente  $\text{CH}_3\text{CH}^+\text{COO}^-$ ) pela incidência de radiação<sup>[22]</sup>.

Comercialmente a alanina apresenta-se no estado sólido como um pó branco cristalino e solúvel em água<sup>[23]</sup>. A Figura 3.3 promove os seus usos como químico industrial:

#### USO

A L-alanina é utilizada na área de nutrição clínica como componente em nutrição enteral e parenteral, e também como ingrediente para medicamentos tais como terapêuticas para a hipertrofia da próstata e em preparações integrais de aminoácidos. Na indústria de alimentos, é empregada com o propósito de enriquecer nutricionalmente alimentos e bebidas além do seu uso como condimento e flavorizante. Outras finalidades incluem seu uso em cosméticos como um fator hidratante natural e em produtos surfactantes, como um material de síntese de vitaminas e agentes antihipertensivos e também como aditivo na alimentação de bovinos.

Figura 3.3 – Promoção comercial dos usos da Alanina<sup>[24]</sup>.

### 3.2. Valina

Na Figura 3.4 é apresentada a estrutura química da valina, cuja fórmula química é ( $C_5H_{11}NO_2$ ).

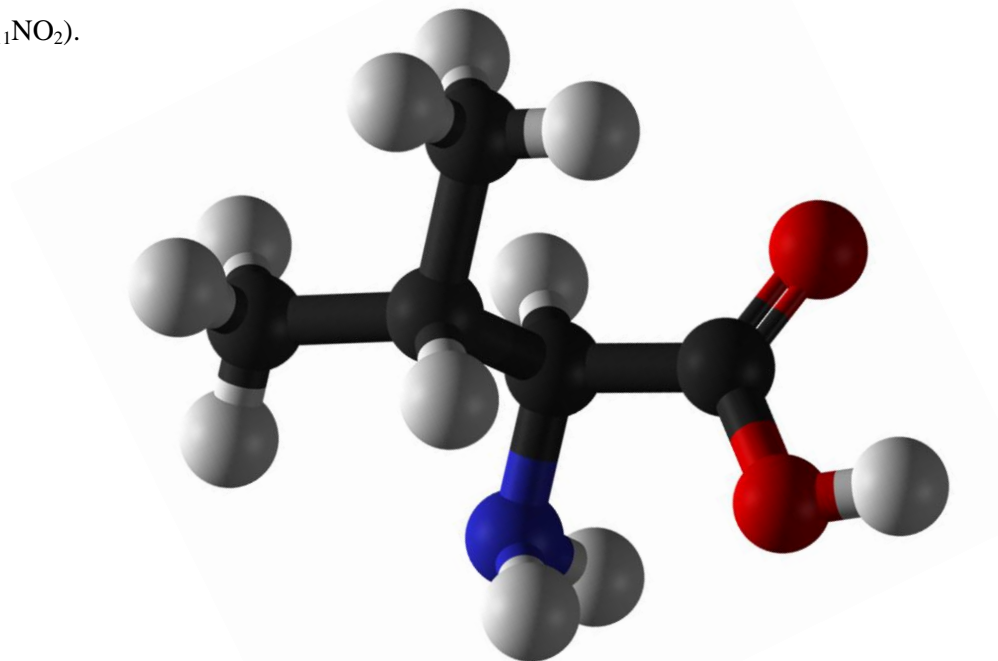


Figura 3.4 – Estrutura química da valina. A azul átomo de N, a vermelho átomos de O, a preto átomos de C e a cinzento átomos de H.

Como se pode constatar da Figura 3.4, a cadeia lateral da valina é constituída por um grupo isopropilo ( $CH(CH_3)_2$ ), colocando a sua massa em 117.15 g/mol. Como já foi referido anteriormente, a valina é um aminoácido essencial e como tal não é passível de ser sintetizado pelo corpo humano, sendo a sua ingestão necessária. Alimentos ricos em valina incluem carne, leite e seus derivados, cogumelos e cereais, entre outros<sup>[25]</sup>. A valina faz parte do grupo de aminoácidos de cadeia ramificada e como tal está presente em quantidades significativas na maior parte das proteínas do corpo humano, sendo vital na manutenção da integridade estrutural e funcional do mesmo<sup>[25]</sup>. Este aminoácido está presente em grandes quantidades nos músculos, sendo necessário ao seu metabolismo. Intervém também na reparação de tecidos e na manutenção do equilíbrio dos níveis de azoto no organismo. Em períodos de deficiência desta molécula, a eficiência da absorção dos restantes aminoácidos e algumas proteínas pelo sistema digestivo é reduzida<sup>[25]</sup>. A substituição do ácido glutâmico pela valina na hemoglobina, devido a uma mutação genética, é a causa da anemia falciforme. Isto deve-se ao facto de o ácido glutâmico, um aminoácido hidrofílico, ser substituído pela valina, que é altamente hidrofóbica, e devido a esta propriedade a hemoglobina não consegue atingir a sua conformação ideal, dando assim origem a esta doença<sup>[25]</sup>.

Comercialmente a valina apresenta-se no estado sólido como um pó branco ou branco-amarelado cristalino e frugalmente solúvel em água<sup>[27]</sup>. A Figura 3.5 promove os seus usos como químico industrial:

**USO**

Além do seu uso habitual em nutrição enteral e parenteral, L-valina é largamente utilizada em combinação com a L-Isoleucina e L-Leucina em preparações ricas em BCAA para pacientes com doenças hepáticas para melhorar seus estados nutricionais. Como fármaco, é usada na forma de preparações de BCAA para casos de hipoalbuminemia em pacientes hepatocirróticos e também em preparações integrais de aminoácidos. Na indústria de alimentos, é um importante componente na nutrição esportiva e alimentos para a saúde. É também usada como flavorizante e como um lubrificante na produção de comprimidos. Outras aplicações incluem seu uso como aditivo nutricional para alimentação animal, na síntese de fármacos, aditivos nutricionais para meios de fermentação e como insumos para substâncias químicas agrícolas.

Figura 3.5 – Promoção comercial dos usos da valina<sup>[28]</sup>.

### 3.3. Estado da arte

A descoberta da interacção entre electrões de baixa energia e a degradação do ADN suscitou um crescente interesse no estudo dos padrões de fragmentação de outras moléculas biológicas<sup>[1]</sup>. Os padrões de fragmentação da alanina e da valina já foram estudados por diversos grupos de investigação através de processos de CED<sup>[22][29]-[34]</sup>. No entanto, no LCAM do CEFITEC recorre-se ao processo de TE para estudar os padrões de fragmentação dos diversos alvos moleculares, nomeadamente constituintes do ADN/ARN, constituintes de proteínas e moléculas de interesse biológico.

Para compreender e prever a fragmentação dos TNIs, precisamos de ter em conta a termodinâmica dos processos moleculares assim como os conceitos de CED e TE. Em CED, o electrão adicional é fornecido à molécula através de um feixe de electrões<sup>[32][33]</sup>. O TNI resultante da formação do ião progenitor pode manter-se através de dissipação do excesso de energia ou decair por um de dois processos concorrentes, a auto-libertação do electrão ou a fragmentação da molécula devido à presença do electrão extra. Os fragmentos iónicos resultantes deste último processo podem ser detectados por espectrometria de massa do tipo TOF.

É relevante apontar que, em estudos de CED, apesar de se utilizar a mesma técnica com parâmetros e condições experimentais muito próximas existem diferenças nos resultados obtidos. A título de exemplo temos os estudos de Papp *et al.*<sup>[32]</sup> e Denifl *et al.*<sup>[33]</sup> para a valina que, apesar de realizados em condições semelhantes, não detectam o mesmo número de fragmentos, havendo uma discrepância de 10 fragmentos entre os dois trabalhos. Foram efectuados estudos de CED para vários aminoácidos<sup>[22][29]-[37]</sup> ou moléculas com semelhantes grupos funcionais, como o ácido fórmico<sup>[38]-[41]</sup> e ácido acético<sup>[42][43]</sup>. De um ponto de vista teórico, foram realizados cálculos teóricos pela Teoria de Funcionais de Densidade<sup>[44][45]</sup> e pelo método multicanal de Schwinger<sup>[46]</sup>.

Os trabalhos efectuados no LCAM do CEFITEC têm-se focado em TE utilizando um feixe de átomos neutros de potássio como dador de electrões às moléculas estudadas, como a timina, o uracilo e a glicina<sup>[15][17][47]-[52]</sup>.

A principal diferença entre os estudos de TE e CED, para além da utilização do feixe de potássio em vez do feixe de electrões livres, consiste na inibição da auto-libertação electrónica por um intervalo de tempo superior na TE devido às forças de Coulomb que se estabelecem quando o catião de potássio está próximo do TNI, o que poderá dar acesso a novos canais de fragmentação, inacessíveis por CED.

Em estudos de TE foi possível verificar que estes processos são selectivos quanto à ligação química e posição na estrutura molecular onde ocorre fragmentação após transferência de electrão. Almeida *et al.*<sup>[11]</sup> verificaram que através da variação da energia transferida para a molécula de timina, timina parcialmente deuterada e uracilo metilado em diferentes posições é possível controlar qual o tipo de ligação química quebrada (C-H ou N-H) para dar origem à perda do anião hidrogénio e também qual a posição nas moléculas em estudo (N<sub>1</sub> ou N<sub>3</sub>) onde ocorre esta quebra.

Se a TE for o processo que descreve mais fielmente o que se passa em meio biológico, então é de referir que deste resulta no caso da colisão de potássio com o aminoácido mais simples, a glicina, a baixas energias (~30 eV) a produção maioritária de um radical H•<sup>[52]</sup>. Se este facto se verificar para os restantes aminoácidos então é um fenómeno de grande relevância, uma vez que, como já mencionado anteriormente, o hidrogénio radicalar é bastante reactivo e tem grande mobilidade, interagindo facilmente com outras estruturas biológicas na sua vizinhança. É também importante considerar a formação, em menor escala, de outras espécies altamente reactivas como O• e OH• radicalares, responsáveis pelo stress oxidativo. Assim, estas espécies em conjunto com os restantes fragmentos aniónicos têm a capacidade de induzir quebras de ligação e reagir com os constituintes celulares nas suas proximidades formando novos compostos, comprometendo a sua integridade biológica.



## Capítulo 4 Montagem Experimental

Neste capítulo apresenta-se a descrição do aparelho experimental utilizado para efectuar os estudos de transferência de electrão por colisões átomo-molécula. Estes estudos foram realizados no LCAM (linha 2) do CEFITEC.

No primeiro subcapítulo apresenta-se uma descrição geral do equipamento, no segundo e terceiro subcapítulos são descritos os componentes relativos à formação dos feixes de potássio e formação do feixe molecular alvo em estudo, respectivamente. O quarto subcapítulo aborda o espectrómetro de massa do tipo tempo de voo e o quinto a tecnologia de vácuo utilizada.

### 4.1. Descrição Geral

O trabalho experimental foi realizado no aparelho de feixes moleculares cruzados esquematicamente representado na Figura 4.1

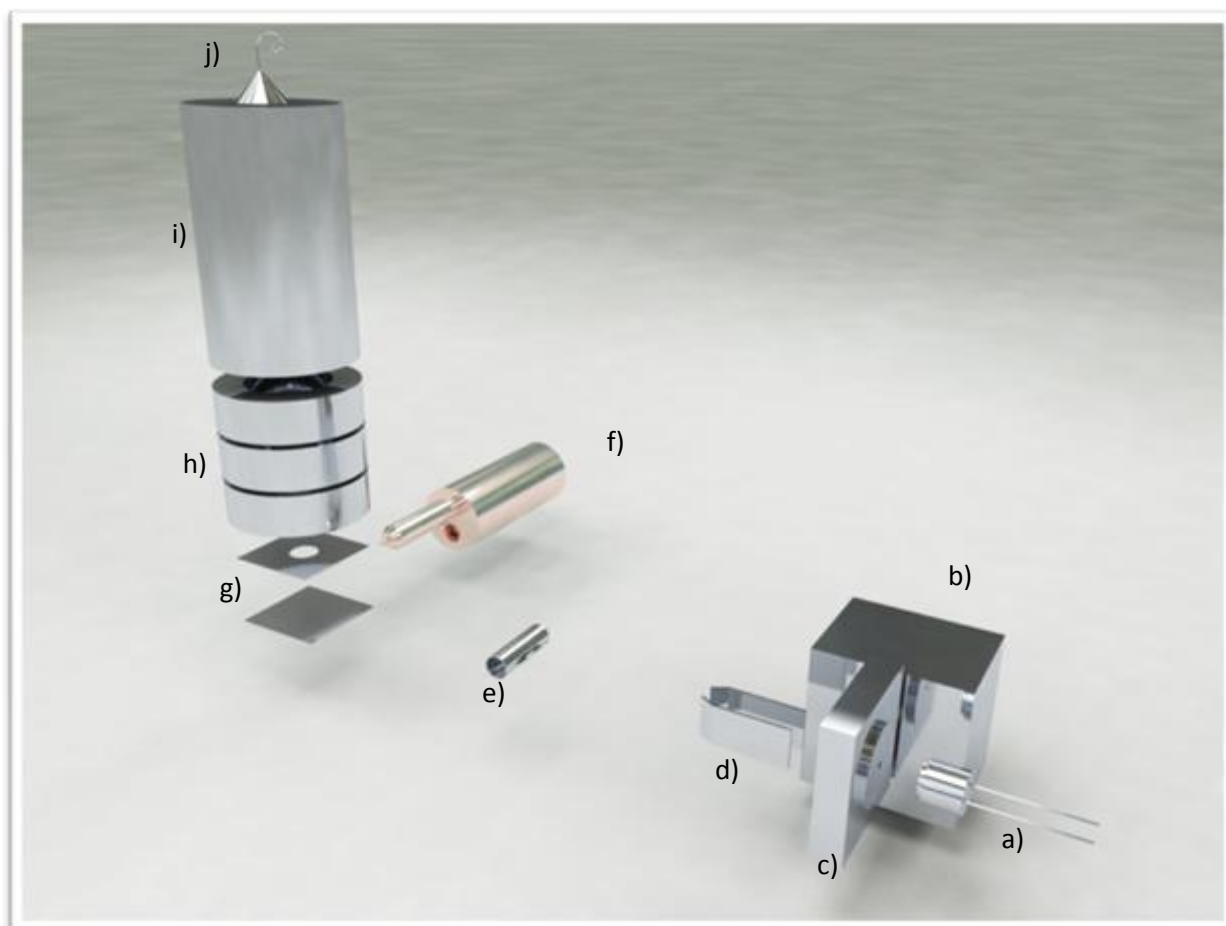


Figura 4.1 – Esquema da montagem experimental. Câmara de potássio: a) Fonte de potássio iónico b) Forno de potássio neutro c) Forno de troca de carga d) Placas deflectoras. Câmara de colisão: e) Detector Langmuir-Taylor f) Forno de moléculas sólidas g) Zona de colisão h) Lentes Einzel i) Tubo de tempo de voo j) Detector Canaltrão<sup>[17]</sup>.

O aparelho consiste em duas câmaras de alto vácuo bombeadas separadamente por uma bomba difusora e uma bomba rotatória cada, atingindo pressões na ordem dos  $10^{-7}$  mbar ( $10^{-5}$  Pa), ligadas entre si por uma válvula intercâmaras.

Na câmara de potássio (Figura 4.1) é produzido o feixe de potássio neutro hipertérmico com a velocidade/energia cinética pretendida através de um processo de troca de carga ressonante. Este feixe atravessa a válvula intercâmaras e entra na câmara de colisão (Figura 4.1), entrando na zona de colisão (centro geométrico da câmara) após passar uma fenda de colimação horizontal de dimensões 5 x 0.5 mm, sendo possível monitorizá-lo à entrada desta câmara por um detector Langmuir-Taylor. Nesta mesma câmara e ortogonalmente ao feixe de potássio é produzido um feixe efusivo do alvo molecular a estudar num forno próprio para o efeito, com uma ponteira de 1 mm de diâmetro por onde sai o feixe, que entra na zona de colisão ao passar também por um orifício de colimação com 1 mm de diâmetro.

A zona de colisão é composta por dois pratos paralelos afastados 1.2 cm um do outro, e desenhada de maneira a que os dois feixes cruzem num plano equidistante aos dois pratos. Aos fragmentos aniónicos resultantes da transferência de electrão ocorrida na colisão entre os dois feixes é aplicado um campo eléctrico normal ao plano de colisão de maneira a extraí-los da zona de colisão. Estes fragmentos passam por um sistema de lentes Einzel que os foca antes de entrarem no tubo do tempo de voo em direcção ao detector do tipo canaltrão de maneira a otimizar a detecção.

## 4.2. Câmara de Potássio

### 4.2.1. Sistema de troca de carga

O processo de troca de carga encontra-se, esquematizado na Figura 4.2.

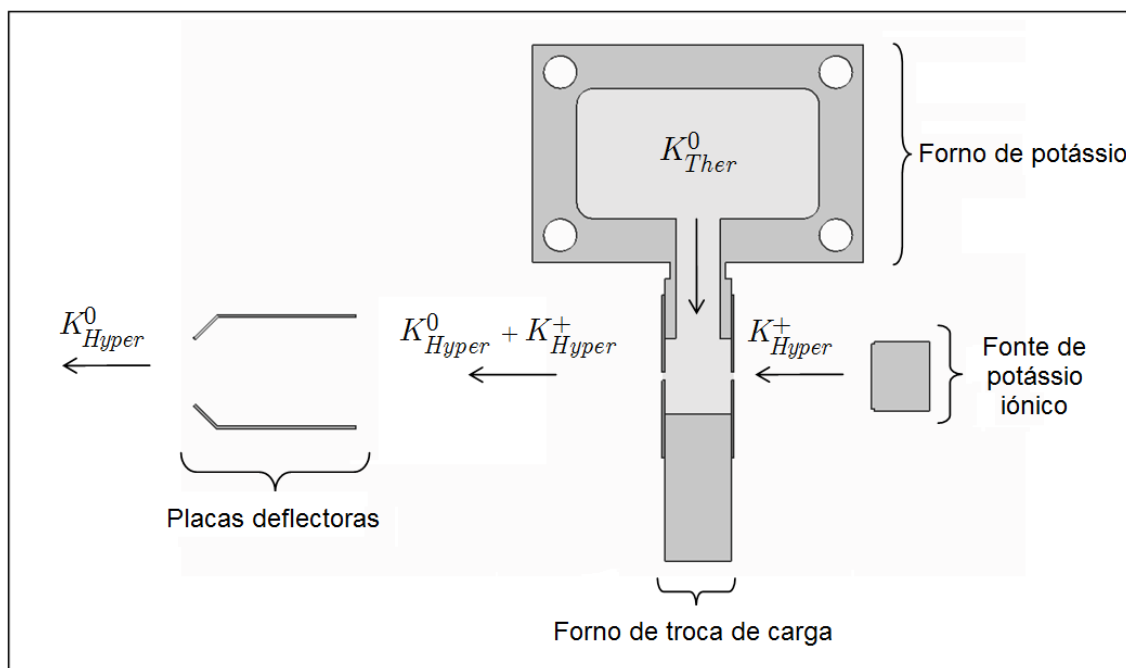
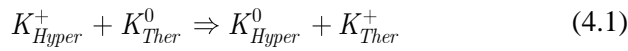


Figura 4.2 – Representação esquemática do sistema de troca de carga<sup>[17]</sup>.



O sistema de troca de carga é constituído por uma fonte de iões de potássio hipertérmico ( $K_{Hyper}^+$ ), um forno de potássio, um forno de troca de carga e um par de placas deflectoras, sendo o seu objectivo o de produzir um feixe de potássio neutro hipertérmico ( $K_{Hyper}^0$ ) com uma determinada velocidade/energia cinética. Quando é aplicada uma determinada tensão à fonte de iões esta vai emitir iões de potássio ( $K_{Hyper}^+$ ), acelerados com uma energia proporcional à tensão aplicada. Estes iões são emitidos na direcção da fenda do forno de troca de carga. No forno de potássio este é vaporizado a uma temperatura de cerca de 420K e forma um gás de potássio neutro térmico ( $K_{Ther}^0$ ) que se desloca para o forno de troca de carga onde (uma pequena parte) interage com os iões de potássio acelerados provenientes da fonte de iões, onde ocorre o processo de troca de carga ressonante, ou seja, os átomos de potássio térmico ( $K_{Ther}^0$ ) doam um electrão aos iões de potássio hipertérmicos ( $K_{Hyper}^+$ ) para que estes se tornem em átomos de potássio neutros hipertérmicos ( $K_{Hyper}^0$ ). Este processo pode ser expresso da seguinte forma:



O forno de troca de carga é aquecido por duas resistências a uma temperatura de 440K, mais elevada que a do forno de potássio, de forma a evitar condensação no seu interior e nas fendas de saída. As fendas do forno de troca de carga têm um diâmetro de 1.5 mm, valor dimensionado de forma a otimizar a densidade e colimação do feixe. As temperaturas dos fornos são controladas por um controlador PID (*Proportional-Integral-Derivative*).

#### 4.2.2. Placas deflectoras

De acordo com a expressão (4.1), à saída do forno de troca de carga temos potássio hipertérmico neutro ( $K_{Hyper}^0$ ) e iões de potássio térmico ( $K_{Ther}^+$ ) mas também iões de potássio hipertérmico ( $K_{Hyper}^+$ ), que não trocaram de carga e como tal é necessário remover todos os iões do feixe. Para esse efeito existem duas placas deflectoras à saída do forno de troca de carga, de forma a remover todos os iões de potássio térmico ( $K_{Ther}^+$ ) e hipertérmicos ( $K_{Hyper}^+$ ), tal como representado na Figura 4.3:

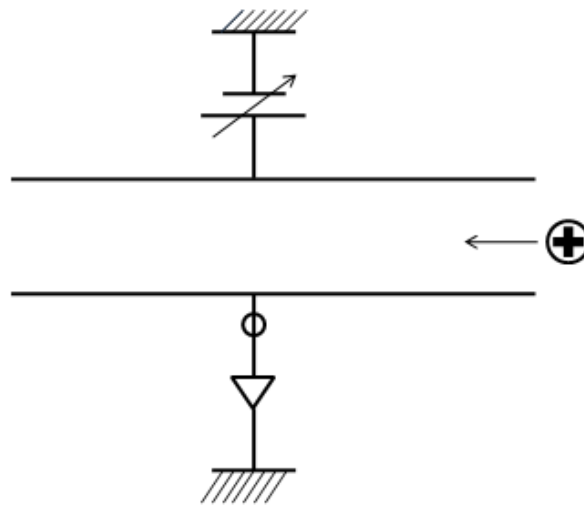


Figura 4.3 – Esquema da montagem das placas deflectoras<sup>[48]</sup>.

A uma das placas é aplicado uma tensão positiva que vai repelir os iões na direcção da outra placa. A esta placa está ligado um electrómetro que permite medir a corrente iónica e assim monitorizar a taxa de produção de iões de potássio. Os valores medidos são geralmente na ordem das dezenas a centenas de nA. O valor da tensão a aplicar varia de acordo com a tensão de aceleração aplicada à fonte de iões.

### 4.3. Câmara de Colisões

A câmara de colisões, para além dos equipamentos descritos de seguida, está equipada com três lâmpadas de aquecimento, de forma a evitar a condensação de moléculas alvo nas paredes da câmara.

#### 4.3.1. Detector Langmuir-Taylor

O detector Langmuir-Taylor está colocado à entrada da câmara de colisões de forma a monitorizar a corrente de potássio neutro que chega a esta câmara.

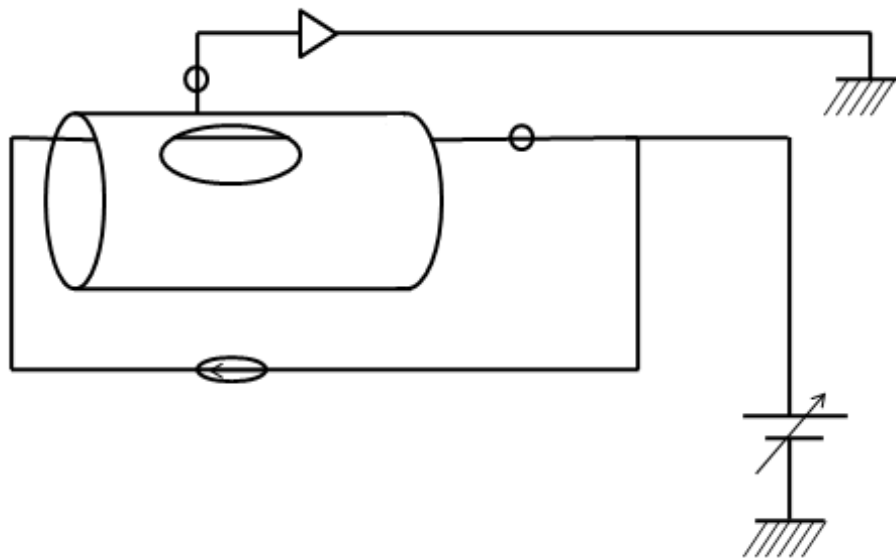


Figura 4.4 – Esquema da montagem do detector Langmuir-Taylor<sup>[48]</sup>.

O detector consiste num colector cilíndrico, dentro do qual passa um filamento de irídio com elevado grau de pureza (>99%) e espessura de 0.125 mm. O colector possui duas aberturas para a entrada e saída do feixe de potássio neutro. Quando em funcionamento, é aplicada ao filamento uma corrente de 630 mA e uma tensão de deflexão de +60 V. Os átomos de potássio neutro hipertérmicos são ionizados no filamento e a tensão aplicada ao filamento repele-os em direcção ao colector cilíndrico. Desta forma cria-se uma corrente no colector proporcional à intensidade do feixe de átomos de potássio hipertérmico, corrente esta que é medida e permite a monitorização do feixe.

#### 4.3.2. Forno de moléculas sólidas

O forno de moléculas sólidas é constituído por um cilindro de cobre exterior, uma ponteira capilar cilíndrica em cobre com uma abertura de 1mm de diâmetro e um contentor cilíndrico removível em aço inoxidável onde se coloca a amostra que encaixa no cilindro de cobre exterior. O cilindro de cobre exterior tem também um orifício para o tubo do sistema de introdução de amostras líquidas ou gasosas e outro para o sensor de temperatura, um termopar do tipo K. O forno é aquecido por uma lâmpada de halogénio que está fixa a um reflector de aço inoxidável que rodeia o forno de forma a uniformizar o aquecimento.

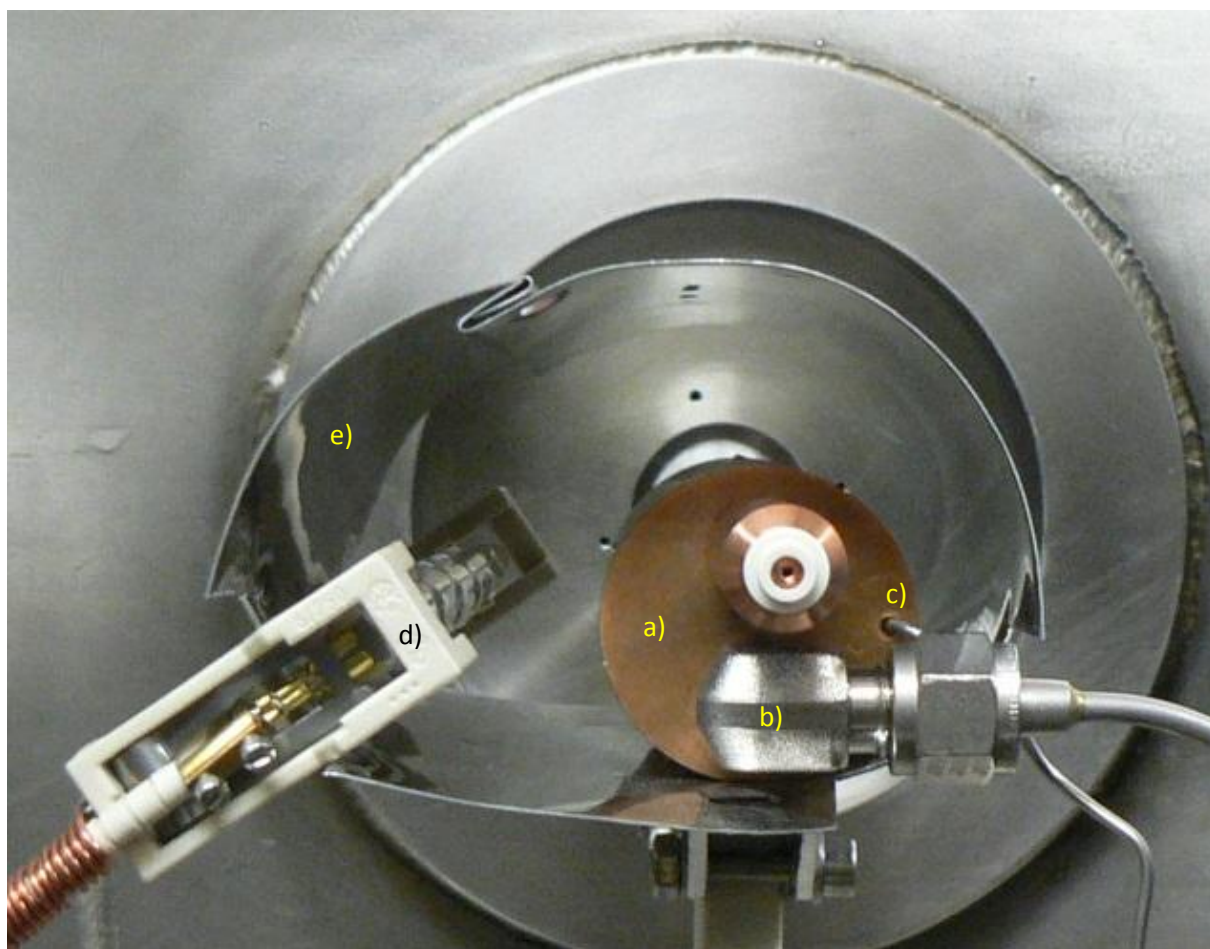


Figura 4.5 – Montagem do forno de moléculas sólidas: a) forno de moléculas sólidas b) tubo de introdução de amostras líquidas ou gasosas c) termopar d) lâmpada de halogénio e) reflector.

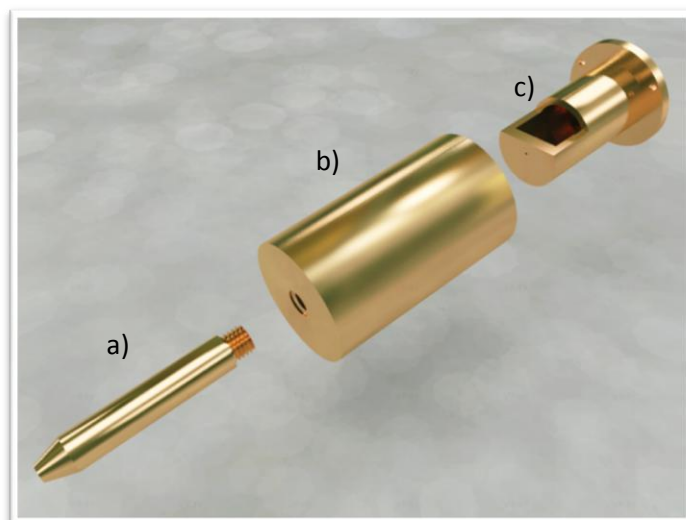


Figura 4.6 – Esquema do forno de moléculas sólidas: a) ponteira capilar b) cilindro exterior c) contentor de amostra<sup>[17]</sup>.

#### 4.4. Espectrómetro de massa do tipo Tempo de Voo

O espectrómetro de massa do tipo tempo de voo (*Time Of Flight* - TOF) é constituído por uma placa de extracção, duas redes, um sistema de lentes Einzel, um tubo de tempo de voo com 1.4 m de comprimento e um detector de partículas carregadas do tipo canaltrão. Para chegar à zona de colisão, entre a placa de deflexão e a rede de extracção, o feixe de potássio tem de atravessar uma fenda de colimação horizontal de dimensões 5 x 0.5 mm e o feixe molecular tem de passar por um orifício de colimação com 1mm de diâmetro.

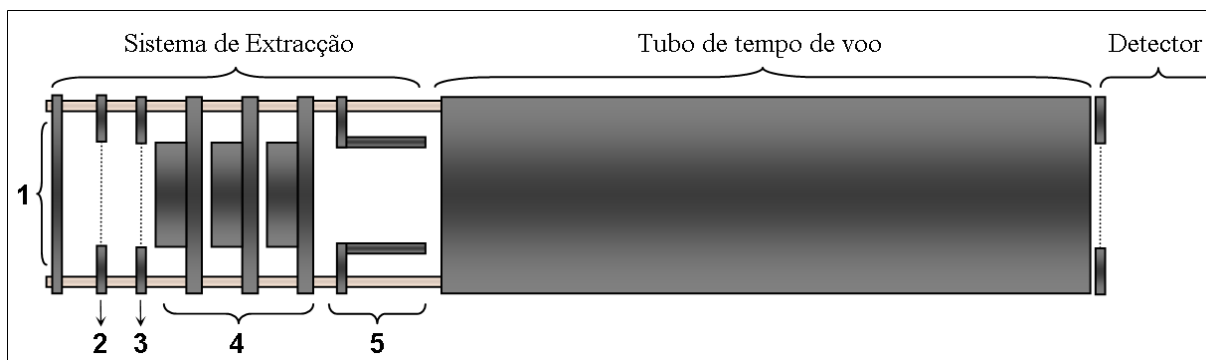


Figura 4.7 – Esquema do sistema de extracção e detecção. 1) Placa de extracção 2) Rede de extracção 3) Rede de aceleração 4) Sistema de lentes Einzel 5) Placas deflectoras.<sup>[17]</sup>

Após a formação de fragmentos aniónicos resultantes da colisão do feixe de potássio neutro acelerado com o feixe molecular na zona de colisão (Figura 4.7 entre 1 e 2) é aplicado um pulso de -340V de curta duração, normalmente 1,25µs, à placa de extracção de forma a extrair os fragmentos aniónicos no sentido ascendente, em direcção à zona de aceleração (Figura 4.7 entre 2 e 3). Após a zona de aceleração passam através das lentes Einzel onde os fragmentos são focados e seguem para o tubo do tempo de voo que é livre de campos eléctricos até chegarem ao detector do tipo canaltrão.

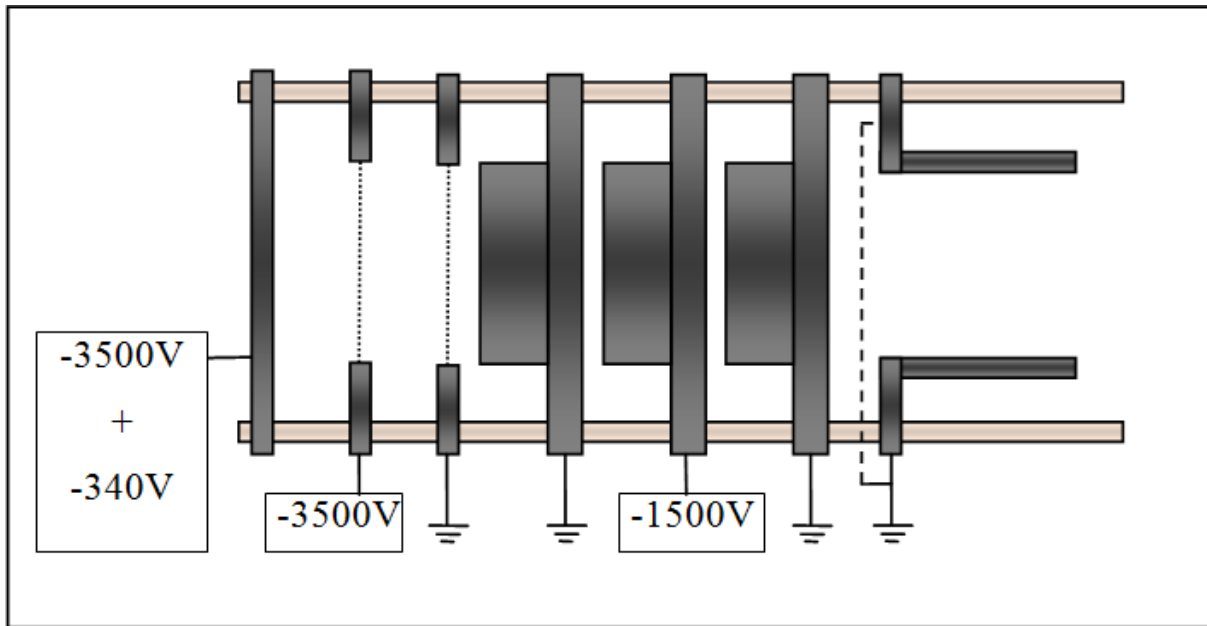


Figura 4.8 – Tensões aplicadas na base do TOF<sup>[17]</sup>.

#### 4.4.1. Lentes Einzel

As lentes Einzel são um conjunto de três cilindros, estando o cilindro central com uma tensão aplicada de -1500V e os restantes ligados à terra. O objectivo destas lentes é concentrar os fragmentos aniónicos extraídos da zona de colisão de forma a convergiem na entrada do detector tipo canaltrão para otimizar a detecção de partículas carregadas.

#### 4.4.2. Detector do tipo Canaltrão

O detector do tipo canaltrão é um dispositivo que quando atingido por partículas carregadas emite electrões secundários. Devido à diferença de (cerca de) 2000V entre a entrada e o fundo do canaltrão estes electrões secundários vão colidir de novo com as paredes do canaltrão e assim gerar cascatas sucessivas de electrões até ao seu interior onde este impulso negativo, com duração de 20ns e -20mV de amplitude, é detectado e processado pelo sistema de tratamento de sinal.

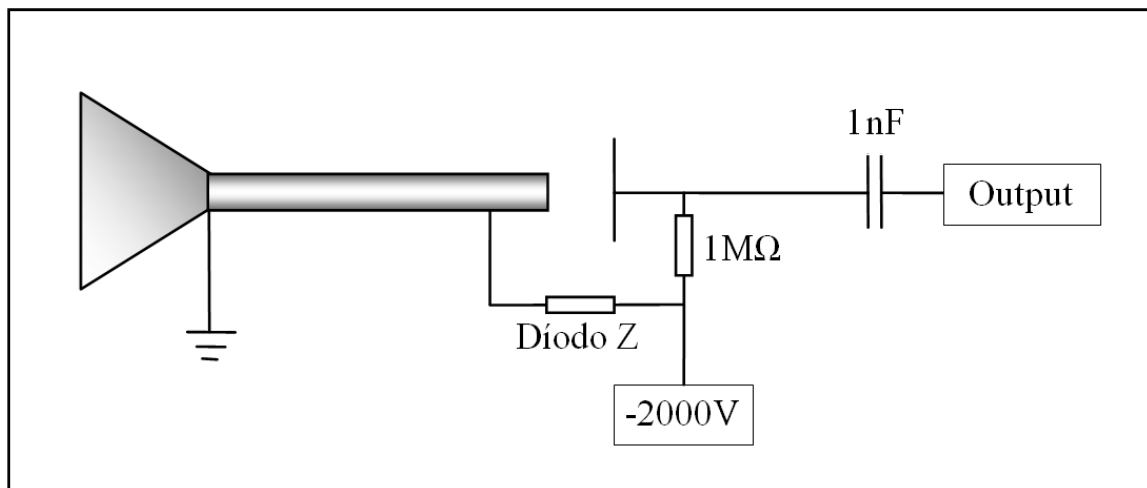


Figura 4.9 – Esquema da configuração electrónica do canaltrão para detecção de aniões<sup>[17]</sup>.

### 4.4.3. Espectros de Massa

#### 4.4.3.1. Considerações de análise de massa

O espectro de massa obtido pelo *software* de aquisição identifica os fragmentos de acordo com a sua razão massa/carga assim como pelas suas intensidades relativas. Esta análise é feita através da aplicação de vários campos eléctricos estáticos, onde os fragmentos são diferenciados através dos seus tempos de voo. O campo eléctrico de extracção é uniforme e tem o valor  $E = \frac{\Delta V}{d}$ , sendo aplicado entre a placa de deflexão e a grelha de extracção, separados por uma distância  $d$  e com uma diferença de potencial entre placas de  $\Delta V$ .

Partículas carregadas sob o efeito de um campo eléctrico  $E$  são aceleradas de acordo com a força  $F_e$  que se traduz como  $F_e = zeE$ . Assim, de acordo com a 2ª lei de Newton, uma partícula carregada em repouso será acelerada por um campo  $E$  da seguinte forma:

$$a = \frac{F_e}{m} = ze \frac{E}{m} = \text{constante} \quad (4.2)$$

com  $e = 1.6 \times 10^{-19} \text{C}$ .

Daqui se conclui que, sendo o campo eléctrico constante e uniforme, os iões que estão sob o efeito de uma força eléctrica constante possuem movimento uniformemente acelerado.

#### 4.4.3.2. Espectros de massa através do tempo de voo

O tempo entre o pulso de extracção e a detecção dos diferentes fragmentos é registado pelo sistema de detecção e o sistema diferencia os diferentes fragmentos pelo tempo que demoram a chegar ao detector. Como o tempo de voo de cada fragmento é proporcional a  $(m/q)^{1/2}$  e todos os fragmentos têm a mesma carga,  $-e$ , então o espectro resultante atribuirá a cada canal uma determinada massa tendo cada canal uma janela de tempo de 8ns e correspondendo a um determinado período de tempo desde que o pulso de extracção foi aplicado.

Como a aceleração aplicada é a mesma para todos os fragmentos então a característica que os separa é a sua massa. Assim, os fragmentos mais leves ganham uma maior velocidade e têm um tempo de voo menor até ao detector e são registados mais cedo enquanto fragmentos com maior massa ganham menor velocidade e consequentemente têm um maior tempo de voo.

## 4.5. Tecnologia de Vácuo

O sistema de bombeamento que suporta o vácuo do aparelho é composto por três bombas rotatórias, duas bombas difusoras e uma bomba turbomolecular.

O vácuo na câmara de potássio (Figura 4.1) é assegurado por uma bomba difusora e uma trapa de azoto líquido entre a câmara e a bomba. Este conjunto é apoiado por uma bomba rotatória de dois

estágios. Entre a bomba rotatória e a difusora está instalada uma válvula magnética e uma trapa de zeólitos de forma a reduzir a contaminação da câmara de alto vácuo por vapores de óleo da bomba rotatória. O vácuo na câmara de colisões (Figura 4.1) é assegurado de forma semelhante ao descrito para a câmara de potássio com a adição de uma bomba rotatória para apoiar o sistema de introdução de amostras líquidas ou gasosas e uma válvula magnética e uma trapa de zeólitos à saída dessa bomba rotatória para prevenir contaminações da amostra. No topo do tubo de tempo de voo, junto ao detector do tipo canaltrão, está também ligada uma bomba turbomolecular que é apoiada pela mesma bomba rotatória que apoia a bomba difusora desta câmara.

As bombas rotatórias estabelecem um vácuo primário ao sistema na ordem dos  $10^{-2}$  mbar (1 Pa) e só depois de o sistema atingir pressões desta magnitude é que se muda o bombeamento para as bombas difusoras e turbomolecular que permite bombear o sistema até ao alto vácuo na ordem dos  $10^{-7}$  mbar ( $10^{-5}$  Pa), ficando as bombas rotatórias a bombear o escape das bombas que asseguram o alto vácuo. A monitorização da pressão é feita por medidores do tipo *pirani* para o vácuo primário e por medidores do tipo *penning* para o alto vácuo. A comunicação entre as duas câmaras é assegurada por uma válvula intercâmaras manual, o que permite manter uma das câmaras em alto vácuo enquanto se procede à manutenção da outra câmara reduzindo assim o tempo de paragem do aparelho pois demora menos tempo a se restabelecer o alto vácuo.

A importância do vácuo neste sistema prende-se com o livre percurso médio, ou seja, a distância média que uma partícula percorre entre duas colisões. Este livre percurso médio pode ser descrito por<sup>[53]</sup>:

$$\lambda \cong \frac{7 \times 10^{-3}}{P_{\text{trabalho}}} (cm) \quad (4.3)$$

Utilizando esta expressão e considerando que durante as medições a pressão média de base era da ordem dos  $6 \times 10^{-7}$  mbar ( $6 \times 10^{-5}$  Pa), então o livre percurso médio é aproximadamente de 116 m. Como a distância desde a zona de criação do feixe de potássio até à zona de colisão é de cerca de 50 cm então podemos afirmar que o processo de colisão é binário.





## Capítulo 5 Resultados e discussão

Este trabalho tem como objectivo o estudo do padrão de fragmentação dos aminoácidos alanina e valina após transferência de electrão através de processo de troca de carga em colisões de átomos de potássio com estas moléculas. Pretendem-se estabelecer correspondências entre este trabalho e estudos anteriores realizados através de processos de CED e aferir o efeito da diferente constituição das cadeias laterais destes dois aminoácidos.

### 5.1. Condições experimentais

Os resultados experimentais foram obtidos num aparelho de feixes moleculares cruzados descrito no Capítulo 4. As medidas correspondentes a colisões de átomos de potássio hipertérmico com as moléculas de alanina e valina foram realizadas para uma gama de energias de laboratório entre 15 e 100 eV. A energia cinética no centro de massa pode ser obtida através da equação (5.1):

$$E_{CM} = V_{Lab} \times 0.9 \times \frac{m_{alvo}}{m_{alvo} + m_{projétil}} \quad (5.1)$$

Em que 0.9 é o factor de eficiência do aparelho,  $m_{projétil}$  é a massa do potássio, 39.09 g/mol, e  $m_{alvo}$  é a massa das moléculas em estudo, alanina e valina, 89.09 g/mol e 116.15 g/mol, respectivamente, e  $V_{lab}$  a tensão de aceleração do feixe de potássio. Para obtermos o valor da energia disponível no processo de colisão para a molécula alvo precisamos de subtrair a energia de ionização do potássio, 4.34 eV, ao valor obtido pela equação (5.1). Estes valores estão disponíveis na Tabela 5.1 para os dois aminoácidos em estudo:

Tabela 5.1 – Valores de energia no centro de massa e energia disponível em função da tensão de aceleração aplicada á fonte de potássio iónico.

| Tensão de aceleração (V) | Alanina       |                   | Valina        |                   |
|--------------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
|                          | $E_{CM}$ (eV) | E disponível (eV) | $E_{CM}$ (eV) | E disponível (eV) |
| 15                       | 9,4           | 5,0               | 10,1          | 5,8               |
| 20                       | 12,5          | 8,2               | 13,5          | 9,2               |
| 30                       | 18,8          | 14,4              | 20,2          | 15,9              |
| 50                       | 31,3          | 26,9              | 33,7          | 29,4              |
| 70                       | 43,8          | 39,5              | 47,2          | 42,9              |
| 100                      | 62,6          | 58,2              | 67,5          | 63,1              |

Os iões negativos resultantes do cruzamentos dos feixes foram extraídos por um pulso de extracção de 340 V/cm. Nas medidas da alanina a duração deste pulso foi de 1,25 $\mu$ s enquanto que para a valina foram feitas medidas com pulsos de extracção com durações de 0,8; 1,0 e 1,25 $\mu$ s. Os espectros de tempo de voo foram obtidos de forma a que as áreas dos picos apresentem uma boa estatística, isto é, uma boa razão sinal/ruído. Neste trabalho consideramos que uma boa estatística implica que o nível do ruído não deve exceder 10% da intensidade máxima dos picos mais abundantes.

Ambas as moléculas em estudo foram adquiridas à *Sigma Aldrich* com um grau de pureza  $\geq 98\%$  no estado sólido e como tal foi necessário aquecê-las no forno de moléculas sólidas de forma a aumentar a sua pressão de vapor para criar um feixe efusivo que cruzou com o feixe de potássio neutro hipertérmico. A temperatura necessária à vaporização da amostra deve ser controlada de maneira a evitar a decomposição térmica desta. Durante as medições a molécula de alanina foi aquecida a uma temperatura de 410K, semelhante ao que foi feito por Ptasińska *et al.*<sup>[22]</sup>. A valina por seu lado foi aquecida apenas a 375K, não tendo sido necessário atingir as temperaturas reportadas por Papp *et al.*<sup>[32]</sup> para obter um feixe efusivo. Este valor está dentro da gama de valores reportado por Denifl *et al.*<sup>[33]</sup> como sendo suficiente para vaporizar a valina.

Para além dos espectros às temperaturas atrás indicadas, foram feitos espectros sem aquecimento das moléculas em estudo de forma a obter o sinal do gás residual designados como "brancos" neste trabalho. A intensidade do feixe de potássio neutro hipertérmico foi medida pelo detector Langmuir-Taylor no início e no fim de cada medição, sendo o valor médio destas duas medições o valor considerado para normalizar o respectivo espectro.

A pressão na câmara de colisões foi, para ambas as moléculas,  $6 \times 10^{-7}$  mbar ( $6 \times 10^{-5}$  Pa) durante a aquisição dos espectros às temperaturas de vaporização enquanto que durante a aquisição dos brancos tinha um valor de  $3 \times 10^{-7}$  mbar ( $3 \times 10^{-5}$  Pa).

Neste trabalho serão apresentados espectros a três diferentes energias de colisão. Os parâmetros de aquisição destes espectros estão nas tabelas 5.2 para a alanina e 5.3 para a valina:

Tabela 5.2 – Parâmetros experimentais para colisões com alanina a 15, 30 e 100 eV.

| Tensão de aceleração (V)               | 15 V         | 30 V         | 100 V        |
|--|--------------|--------------|--------------|
| Número de canais                       | 4096         | 4096         | 4096         |
| Largura de cada canal                  | 8 ns         | 8 ns         | 8 ns         |
| Tempo de aquisição                     | 166920 s     | 86400 s      | 56400 s      |
| Duração do pulso de extracção          | 1,25 $\mu$ s | 1,25 $\mu$ s | 1,25 $\mu$ s |
| Corrente Langmuir-Taylor (valor médio) | 0,20 pA      | 0,18 pA      | 1,77 pA      |

Tabela 5.3 – Parâmetros experimentais para colisões com valina a 15, 30 e 100 eV.

| Tensão de aceleração (V)               | 15 V        | 30 V         | 100 V       |
|--|-------------|--------------|-------------|
| Número de canais                       | 4096        | 4096         | 4096        |
| Largura de cada canal                  | 8 ns        | 8 ns         | 8 ns        |
| Tempo de aquisição                     | 142300 s    | 137700 s     | 16900 s     |
| Duração do pulso de extração           | 0,8 $\mu$ s | 1,25 $\mu$ s | 1,0 $\mu$ s |
| Corrente Langmuir-Taylor (valor médio) | 0,09 pA     | 0,45 pA      | 3,85 pA     |

## 5.2. Tratamento e calibração de espectros

Todo o tratamento e calibração dos espectros obtidos foi feito utilizando o programa *Origin*. Depois de obtidos os espectros para as várias energias à temperatura de vaporização e os respectivos brancos foi necessário subtrair estes aos primeiros. Para que esta subtração seja válida é preciso que os espectros sejam normalizados, de acordo com a expressão (5.2):

$$\frac{C}{t \times I_{LT}} \quad (5.2)$$

Onde  $C$  é o número de contagens em cada canal,  $t$  é o tempo de aquisição e  $I_{LT}$  é o valor médio da corrente medido pelo detector Langmuir-Taylor. Após esta normalização subtraiu-se os brancos aos respectivos espectros. De seguida foi aplicado um filtro *smoothing* utilizando o método Savitzky-Golay<sup>[54]</sup> aos espectros resultantes. Os espectros foram de seguida divididos pelo seu valor mais elevado, de forma a normalizar a intensidade à unidade. Após o tratamento dos espectros estes foram calibrados de forma a fazer corresponder os canais a massas. Todos os espectros foram calibrados individualmente, fazendo uso de picos que aparecem em todos os espectros e fáceis de identificar pela sua relativa abundância, tais como os picos correspondentes às massas 1, 16, 17, 24, 25, 26 u.m.a. e os picos correspondentes ao ião progenitor desidrogenado para a alanina e a valina, com massa 88 e 116 u.m.a., respectivamente. Aos canais foram feitos corresponder as massas dos respectivos picos através de um ajuste polinomial de segundo grau pois este é o que melhor descreve a característica dos espectros produzidos pelo espectrómetro do tipo tempo de voo utilizado. Com a ajuda desta calibração inicial foram identificados os restantes picos. Todas as calibrações resultantes apresentaram um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) superior a 0.999. Posteriormente foi criada e subtraída uma linha de base, de forma a remover o ruído de fundo e o "arrastamento" de alguns picos que, no caso de picos consecutivos, faz com que estes, à excepção do primeiro, tenham uma contribuição do pico anterior, aparecendo no espectro com uma intensidade maior que a que realmente têm. A calibração foi refeita depois desta subtração, sendo esta a calibração final.

### 5.3. Resultados

Neste subcapítulo são apresentados os espectros para baixas, médias e altas energias para ambas as moléculas, comparamos os fragmentos aniônicos identificados com os apresentados por estudos anteriores e procedeu-se à análise dos fragmentos obtidos.

#### 5.3.1. Resultados dos espectros a baixas, médias e altas energias

Nas Figuras 5.1 a 5.6 estão apresentados os espectros para 15, 30 e 100 eV (no referencial do laboratório) para a alanina e a valina.

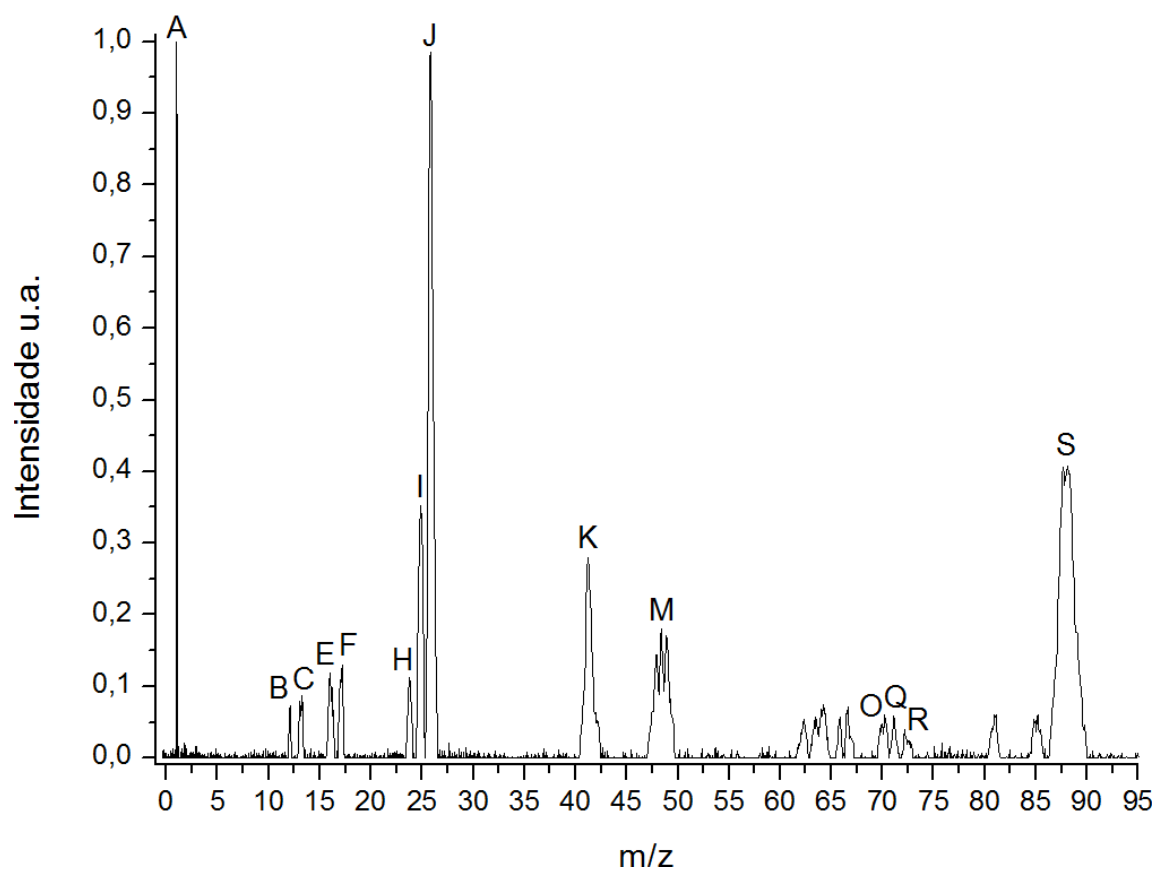


Figura 5.1 – Espectro da alanina a 15 eV.

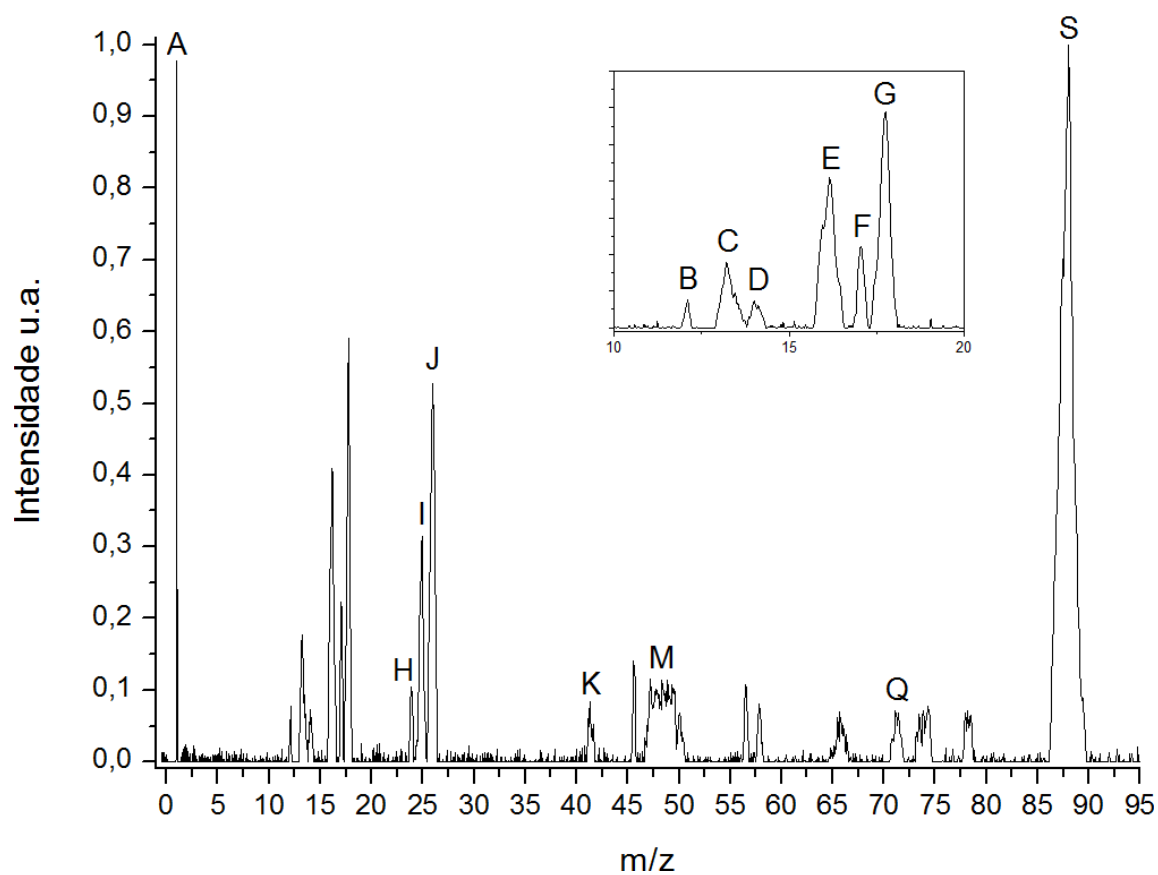


Figura 5.2 – Espectro da alanina a 30 eV.

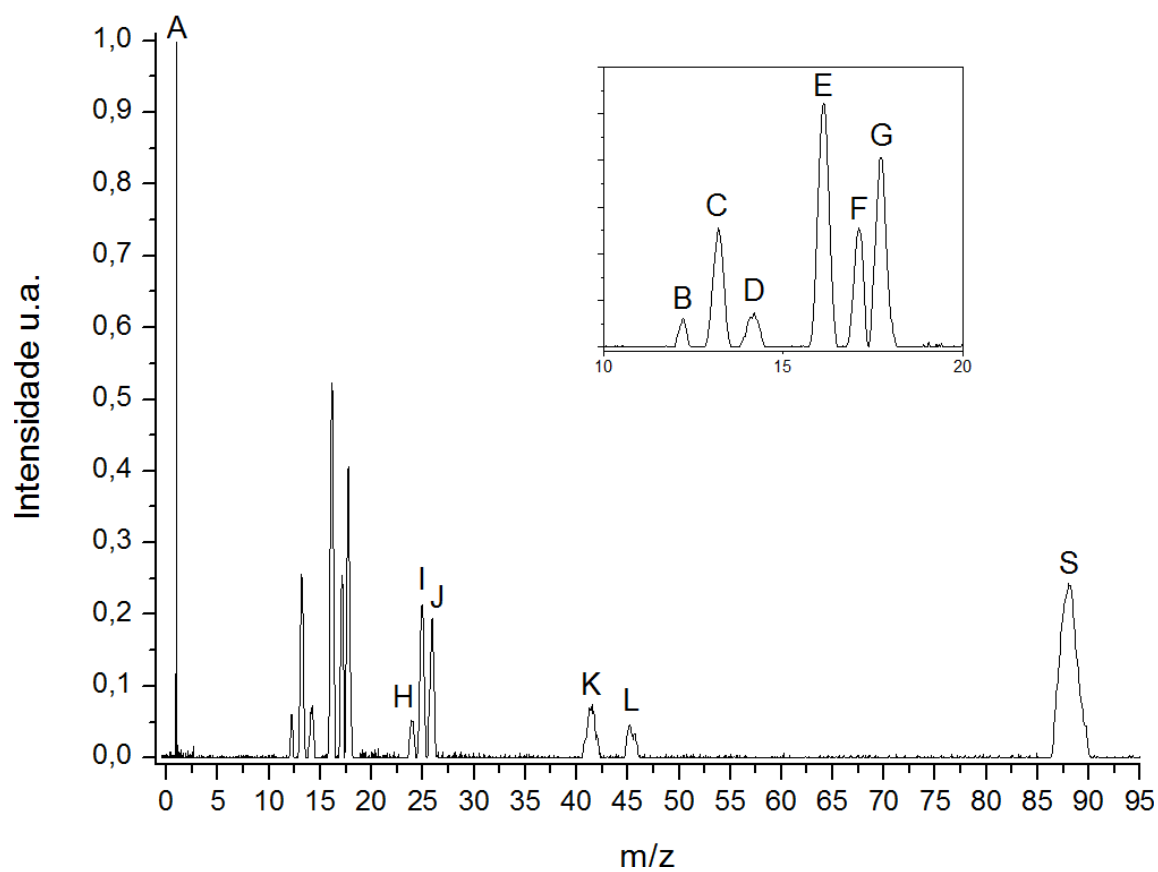


Figura 5.3 – Espectro da alanina a 100 eV.

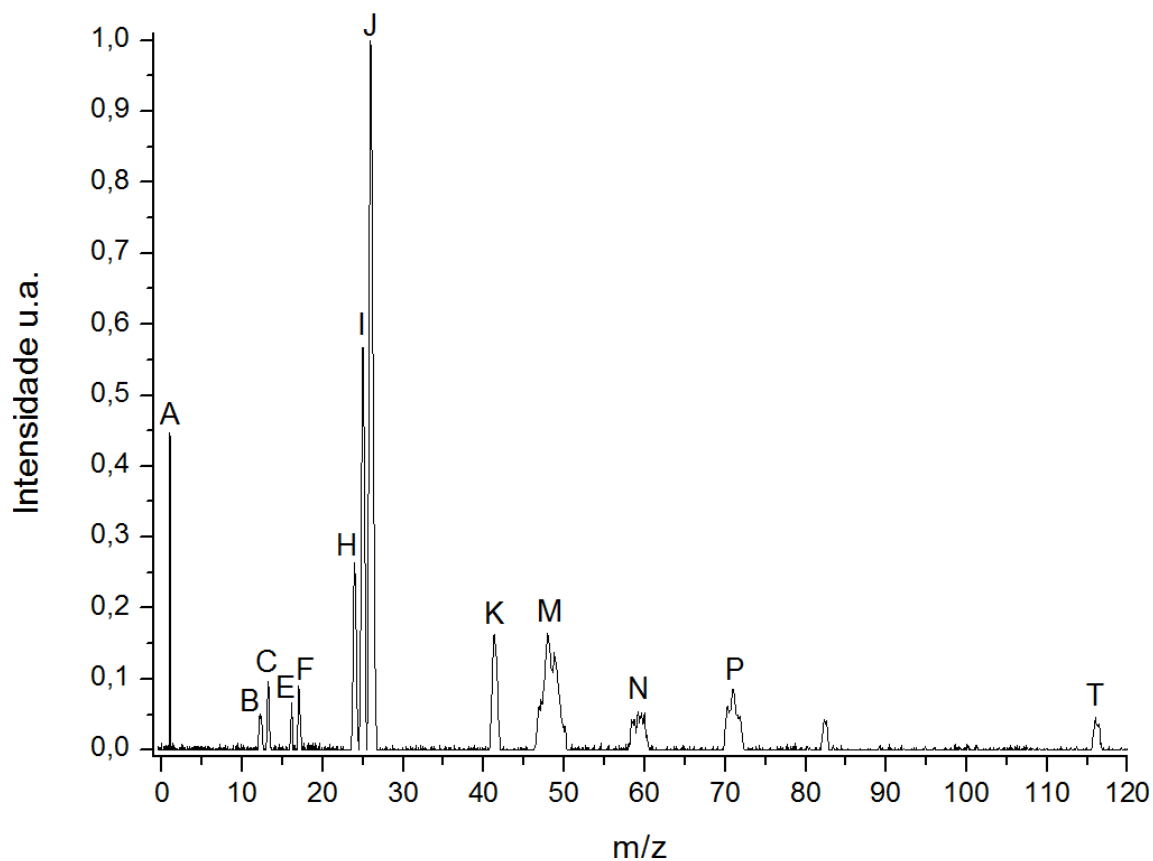


Figura 5.4 – Espectro da valina a 15 eV.

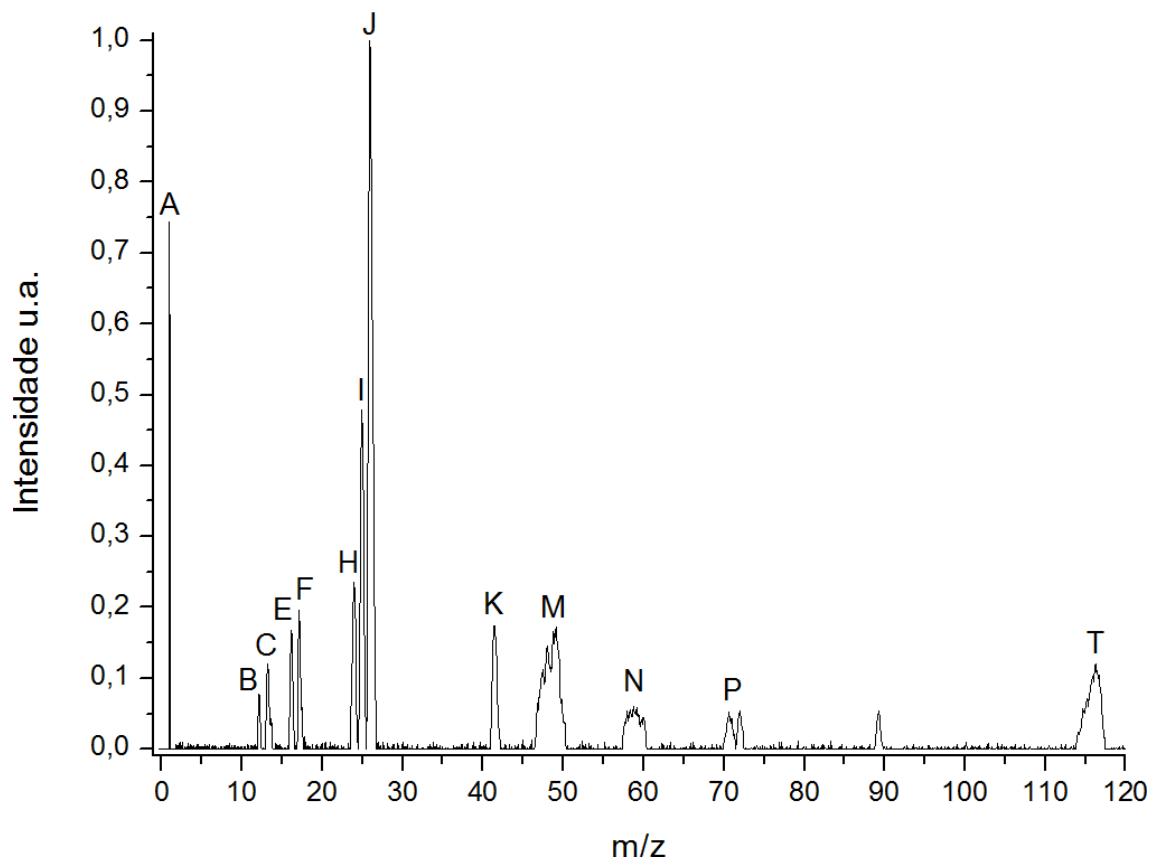


Figura 5.5 – Espectro da valina a 30 eV.

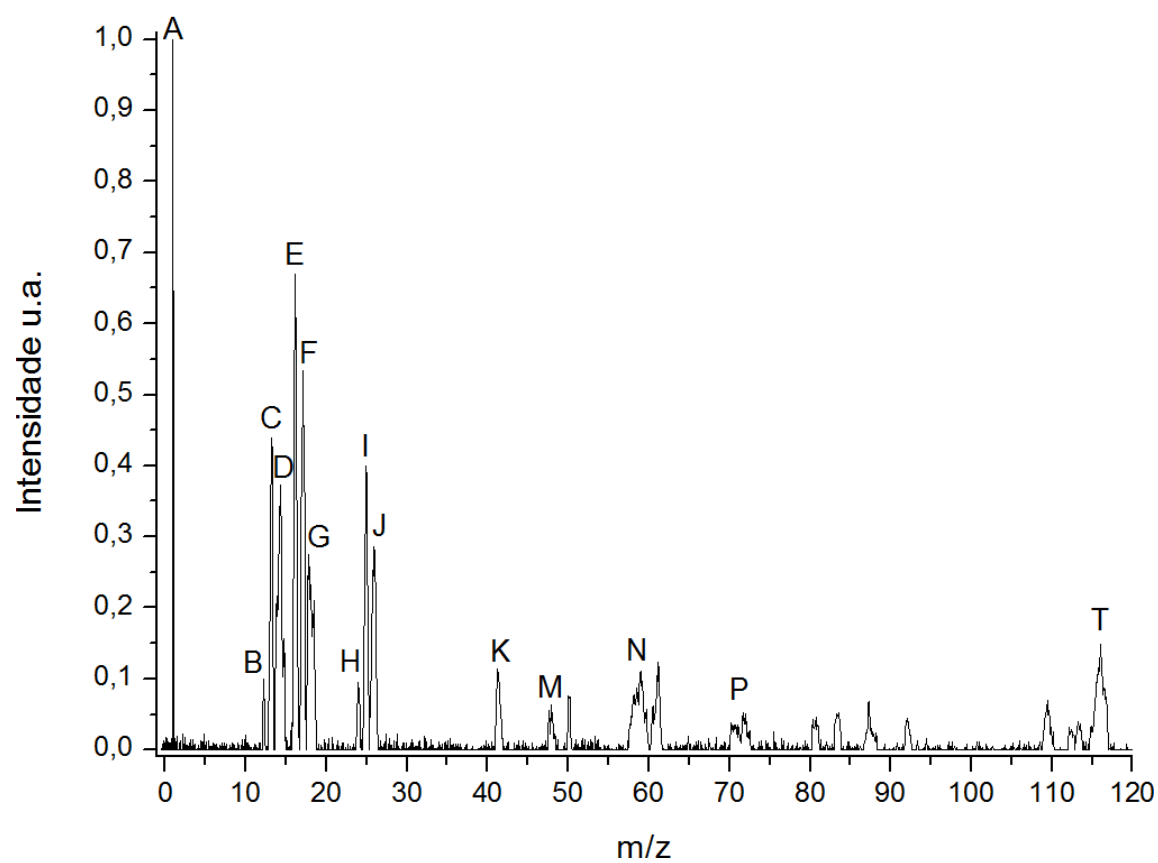


Figura 5.6 – Espectro da valina a 100 eV.

### 5.3.2. Análise dos fragmentos obtidos

Tabela 5.4 – Comparação de fragmentos aniônicos observados através de colisões potássio-alanina numa gama de energias dos 15 aos 100 eV com trabalhos anteriores de CED. Letras referentes às Figuras 5.1, 5.2 e 5.3.

| Trabalho actual |       |        | Massa<br>(u.m.a.) | Fragmentos<br>Aniônicos  | Trabalhos<br>anteriores |
|-----------------|-------|--------|-------------------|--|-------------------------|
| 15 eV           | 30 eV | 100 eV |                   |  |                         |
| A               | A     | A      | 1                 | H <sup>-</sup>   | [22], [29]              |
| B               | B     | B      | 12                | C <sup>-</sup>   |                         |
| C               | C     | C      | 13                | CH <sup>-</sup>  |                         |
| -               | D     | D      | 14                | CH <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | [29]                    |
| -               | -     | -      | 15                | CH <sub>3</sub> <sup>-</sup>   | [29], [30]              |
| E               | E     | E      | 16                | O <sup>-</sup> /NH <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | [22], [29]              |
| F               | F     | F      | 17                | OH <sup>-</sup>  | [22], [29], [30]        |
| -               | G     | G      | 17,5              | Decaimento metastável  |                         |
| H               | H     | H      | 24                | C <sub>2</sub> <sup>-</sup>  |                         |
| I               | I     | I      | 25                | C <sub>2</sub> H <sup>-</sup>  |                         |
| J               | J     | J      | 26                | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> <sup>-</sup> /CN <sup>-</sup>  | [22], [30]              |
| -               | -     | -      | 27                | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> <sup>-</sup>   | [30]                    |
| -               | -     | -      | 28                | CH <sub>2</sub> N <sup>-</sup>   | [30]                    |
| -               | -     | -      | 40                | C <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | [30]                    |
| K               | K     | K      | 41                | CHCO <sup>-</sup>  | [30]                    |
| -               | -     | -      | 42                | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>-</sup> /NCO <sup>-</sup>   | [22], [30]              |
| -               | -     | -      | 44                | CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | [30]                    |
| -               | -     | L      | 45                | COOH <sup>-</sup> /CHOO <sup>-</sup>   | [22], [30]              |
| M               | M     | -      | 48                | Decaimento metastável  |                         |
| O               | -     | -      | 70                | C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> NO <sup>-</sup> /C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | [22], [30], [31]        |
| Q               | Q     | -      | 71                | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | [30], [31]              |
| R               | -     | -      | 72                | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> /C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NO <sup>-</sup> | [22], [30], [31]        |
| -               | -     | -      | 73                | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | [30], [31]              |
| -               | -     | -      | 86                | C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | [30]                    |
| S               | S     | S      | 88                | CH <sub>3</sub> CH(NH <sub>2</sub> )COO <sup>-</sup>   | [22], [30]              |



Tabela 5.5 – Comparação de fragmentos aniônicos observados através de colisões potássio-valina numa gama de energias dos 15 aos 100 eV com trabalhos anteriores de CED. Letras referentes às Figuras 5.4, 5.5 e 5.6.

| Trabalho actual |       |        | Massa<br>(u.m.a.) | Fragmentos<br>Aniônicos   | Trabalhos<br>anteriores |
|-----------------|-------|--------|-------------------|---|-------------------------|
| 15 eV           | 30 eV | 100 eV |                   |   |                         |
| A               | A     | A      | 1                 | H <sup>-</sup>  |                         |
| B               | B     | B      | 12                | C <sup>-</sup>  |                         |
| C               | C     | C      | 13                | CH <sup>-</sup>   |                         |
| -               | -     | D      | 14                | CH <sub>2</sub> <sup>-</sup>  |                         |
| E               | E     | E      | 16                | O <sup>-</sup> /NH <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | [33]                    |
| F               | F     | F      | 17                | OH <sup>-</sup>   | [32], [33]              |
| -               | -     | G      | 17,5              | Decaimento metastável   |                         |
| H               | H     | H      | 24                | C <sub>2</sub> <sup>-</sup>   |                         |
| I               | I     | I      | 25                | C <sub>2</sub> H <sup>-</sup>   |                         |
| J               | J     | J      | 26                | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> <sup>-</sup> /CN <sup>-</sup>   | [32], [33]              |
| K               | K     | K      | 41                | CHCO <sup>-</sup>   |                         |
| -               | -     | -      | 45                | COOH <sup>-</sup> /CHOO <sup>-</sup>  | [32], [33]              |
| -               | -     | -      | 46                | CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | [33]                    |
| M               | M     | M      | 48                | Decaimento metastável   |                         |
| -               | -     | -      | 56                | C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sup>-</sup> /C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> N <sup>-</sup>                | [32], [33]              |
| N               | N     | N      | 59                | CHNO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>                 |                         |
| P               | P     | P      | 71                | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sup>-</sup>  |                         |
| -               | -     | -      | 72                | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sup>-</sup>   | [32], [33]              |
| -               | -     | -      | 74                | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | [33]                    |
| -               | -     | -      | 98                | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sup>-</sup>   | [31], [33]              |
| -               | -     | -      | 99                | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | [31], [33]              |
| -               | -     | -      | 100               | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sup>-</sup> /C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | [31], [32], [33]        |
| -               | -     | -      | 101               | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | [31], [33]              |
| -               | -     | -      | 115               | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | [33]                    |
| T               | T     | T      | 116               | (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH(NH <sub>2</sub> )COO <sup>-</sup>                                    | [32], [33]              |

### 5.3.2.1 Fragmentos detectados em estudos anteriores

#### - Aniões progenitores desidrogenados [Ala-H]<sup>-</sup> e [Val-H]<sup>-</sup>

Estes aniões são comumente designados como aniões progenitores desidrogenados pois resultam da perda de um átomo de hidrogénio pelos TNI correspondentes, [Ala]<sup>-</sup> e [Val]<sup>-</sup>.

Nos espectros obtidos para a alanina, este fragmento tem um aumento de intensidade entre os espectros de 15 para 20 eV, onde é o fragmento mais intenso, e a partir daí vai decrescendo à medida que se aumenta a energia no centro de massa. Este comportamento pode ser explicado pela inibição da auto-libertação do electrão a baixas energias. Para estes valores de energia de colisão, a velocidade do potássio é menor do que a energias mais elevadas e como tal permanece na vizinhança do TNI por um intervalo de tempo maior, permitindo assim uma maior interação coulombiana que promove a estabilização do complexo molecular, diminuindo a probabilidade de o electrão transferido ser ejectado da molécula alvo. Para energias mais elevadas, a diminuição da intensidade relativa deste fragmento pode ser explicada devido ao aumento da energia transferida para a molécula, o que pode promover outros canais de fragmentação. Pode ainda acontecer que este fragmento ao ser formado com excesso de energia interna possa por sua vez fragmentar-se em aniões mais leves, dando origem ao decaimento metastável.

Nos espectros obtidos para a valina, verifica-se o aumento de intensidade entre os espectros de 15 e 20 eV mas ao contrário do que se verificou em estudos anteriores<sup>[32][33]</sup> e no comportamento aqui observado para a alanina este pico não é o fragmento dominante. O facto de se ter utilizado tempos de extracção mais reduzidos no espectro a 15 eV, com o objectivo de obter uma melhor definição nos picos associados a fragmentos mais leves, pode ter afectado a intensidade detectada para este fragmento. De facto, para a energia de 20 eV, foram obtidos espectros com tempos de extracção de 1 µs e 1,25 µs e neste último a intensidade deste pico era ligeiramente maior. No entanto esta diferença não justifica a fraca intensidade destes picos para as várias energias em comparação com o que foi obtido para a alanina. Uma possível explicação pode estar relacionada com a maior complexidade da cadeia lateral da valina, cujo maior número de graus de liberdade dá origem a mais locais de fragmentação que podem concorrer com a formação deste fragmento. Este efeito associado à presença do ião K<sup>+</sup> no complexo de colisão poderá ser a causa da diferença destes resultados com os de estudos anteriores em CED<sup>[32][33]</sup>.

Estudos teóricos efectuados por Rescigno *et al.*<sup>[40]</sup> mostraram que para ácidos carboxílicos como o ácido fórmico onde o electrão é capturado pela orbital  $\pi^*$  do grupo COOH conduzindo à formação de um anião progenitor desidrogenado de camada fechada e um radical H•. Estudos de CED para o ácido fórmico<sup>[41]</sup> e ácido acético<sup>[43]</sup> indicam a origem deste fragmento através de ressonâncias a 1,2 e 1,5 eV respectivamente, valores próximos dos reportados para a alanina e valina em estudos de CED<sup>[22][33]</sup>. Estes estudos para a alanina e valina indicam também a contribuição de ressonâncias entre 5 e 6 eV sendo o acesso a estas ressonâncias uma possível explicação para o aumento de intensidade deste fragmento entre os espectros a 15 e os a 20 eV, uma vez que a 15 eV, de acordo com os valores

da tabela 5.1, estas ressonâncias entre 5 e 6 eV são parcialmente acedidas enquanto que nos espectros a 20 eV estão completamente acessíveis. Rescigno *et al.*<sup>[40]</sup> concluíram também que o acoplamento entre a orbital  $\sigma^*$  e  $\pi^*$  de menor energia do grupo carboxila pode ser responsável pela fragmentação ao longo da ligação O-H levando à perda do átomo de hidrogénio. Denifl *et al.*<sup>[33]</sup> propuseram que a estrutura das ressonâncias detectadas para este fragmento podem estar associadas à competição entre CED e a excitação vibracional do *stretch mode* do grupo OH ou às ressonâncias vibracionais de Feshbach associadas aos estados dipolares, considerando que esta última alternativa era suportada por estudos teóricos utilizando teoria de *R-matrix*<sup>[55]</sup>. De acordo com estes estudos, o mecanismo de CED ocorre através de captura do electrão pela orbital  $\sigma^*$  do grupo OH e não pelo acoplamento entre orbitais  $\sigma^*$  e  $\pi^*$ . Ambos os estudos para alanina e valina atribuem as ressonâncias de menor intensidade entre 5 e 6 eV à abstracção de um átomo de hidrogénio de outros locais da molécula, ao carbono central no caso da alanina e ao grupo  $\text{NH}_2$  no caso da valina<sup>[22][33]</sup>.

De um ponto de vista biológico, a ocorrência dos processos aqui descritos é de extrema importância, pois a formação deste fragmento implica a formação de uma espécie neutra radicalar livre,  $\text{H}\cdot$ , que é altamente reactiva e devido à sua pequena massa tem grande mobilidade. Esta espécie tem um grande potencial de causar dano em meio biológico pois é iniciadora de muitas reacções, interagindo com as estruturas na sua vizinhança podendo dar origem a outras espécies potencialmente tóxicas ou causar quebra de ligações moleculares causando a perda de funcionalidade ou desagregação dessas mesmas estruturas, o que no caso do ADN pode ter consequências relativamente à sua integridade.

#### - $[\text{Ala-OH}]^-/[\text{Ala-NH}_3]^+$ (72 u.m.a.)

Este fragmento foi identificado por Ptasińska *et al.*<sup>[22]</sup> como resultado da perda do grupo OH ou do grupo  $\text{NH}_3$ , presente quando a alanina toma a forma "zwitteriónica", apresentando ressonâncias a 1,7; 4,9 e 9,1 eV. Posteriormente, Shchukin *et al.*<sup>[30][31]</sup>, utilizando uma resolução em massa superior, foram capazes de identificar que as ressonâncias a 1,7 e 9,1 eV estavam associadas à perda do grupo  $\text{NH}_3$  enquanto que a ressonância a 4,9 eV estava associada à perda do grupo OH. Ambos os fragmentos são possíveis com a energia disponível nos espectros a 15 eV de acordo com a tabela 5.1. Este fragmento não foi detectado para energias superiores, podendo este facto ser explicado pela preferência de outros canais de dissociação ou pelo aumento da energia interna levar à formação de fragmentos mais leves.

Estudos de TE ainda não publicados efectuados no LCAM do CEFITEC para o ácido acético mostram que o único fragmento para essa molécula correspondente à perda da massa 17, OH, aparece apenas para energias de laboratório a partir dos 50 eV. À luz destes resultados consideramos que possivelmente neste estudo, para esta massa, só ocorra perda do grupo  $\text{NH}_3$ .

Do ponto de vista biológico este canal de fragmentação é relevante uma vez que produz um fragmento neutro radicalar,  $\text{OH}\cdot$ , bastante reactivo, podendo causar quebras de ligações nas estruturas

biológicas nas suas proximidades ou formar novas espécies. A quebra da ligação C-N que dá origem ao fragmento  $\text{NH}_3$  também causa a ruptura da ligação peptídica, causando a fragmentação do péptido ou proteína em que este aminoácido se encontra, levando à perda da estrutura tridimensional e consequentemente da sua funcionalidade.

**-  $[\text{Ala-NH}_2\text{-H}_2]/[\text{Ala-NH}_3\text{-H}]/[\text{Ala-NH}_2\text{-2H}]$  (71 u.m.a.)**

Estes fragmentos foram identificados por Shchukin *et al.*<sup>[30][31]</sup>, associados a ressonâncias de 5,8 eV e 9,0 eV. Para baixas energias, de acordo com os valores da tabela 5.1, apenas as duas primeiras formas são possíveis, estando associadas à ressonância centrada em 5,8 eV, cujo pico tem início a cerca de 5 eV. Para os espectros a 20 e 30 eV a energia disponível na colisão para esta molécula é superior a 8 eV, sendo possível aceder à ressonância centrada em 9 eV com início em 7,3 eV e assim à terceira forma de fragmentação, possibilitando a formação de dois radicais  $\text{H}^\bullet$  em vez de hidrogénio molecular ou apenas um radical  $\text{H}^\bullet$ .

**-  $[\text{Ala-H-H}_2\text{O}]/[\text{Ala-H}_2\text{-NH}_3]$  (70 u.m.a.)**

Estes fragmentos foram identificados para esta massa por Ptasińska *et al.*<sup>[22]</sup> associados a ressonâncias a 5,5 e 8,8 eV. Posteriormente, Shchukin *et al.*<sup>[30][31]</sup>, identificaram esta massa como resultado da perda de  $\text{H}_2\text{O}$  e um átomo de hidrogénio radicalar, tendo possivelmente o anião progenitor desidrogenado proveniente da ressonância de menor intensidade a cerca de 5 eV como precursor, seguido de um rearranjo interno. Tal como o fragmento de massa 72 u.m.a., só está presente nos espectros a 15 eV, sendo acessível para a alanina pois o pico centrado a 5,5 eV tem início a cerca de 5 eV e a energia disponível é de 5 eV de acordo com os valores calculados na tabela 5.1.

**-  $\text{COOH}^\bullet/\text{CHOO}^\bullet$  (45 u.m.a.)**

Este fragmento foi identificado por Ptasińska *et al.*<sup>[22]</sup> associado à captura do electrão pela orbital  $\pi^*$  do grupo carboxila, com ressonâncias a 2,7; 5,67 e 9,0 eV. Neste estudo este fragmento aparece apenas para a alanina e curiosamente só no espectro para 100 eV. Para os espectros entre 30 e 70 eV aparece um pico que, de acordo com a calibração, corresponde à massa 45,5 u.m.a.. Apesar de muito próximo considera-se que este pico é independente da massa 45 u.m.a..

Do ponto de vista biológico este canal de fragmentação é relevante pois este fragmento resulta da remoção do grupo carboxila, o que a acontecer numa molécula inserida num péptido ou proteína causa a ruptura destas estruturas.

**-  $\text{CHCO}^\bullet$  (41 u.m.a.)**

Este fragmento foi identificado para a alanina por Muftakhov *et al.*<sup>[30]</sup> associado a uma ressonância que vai desde 5 a 12 eV, estando também presente uma ressonância de menor intensidade a 3,9 eV. Apesar de não ter sido identificado em nenhum estudo para a valina, neste trabalho este fragmento é também formado para a valina. Se considerarmos que este fragmento resulta de quebras

de ligações da molécula e não de processos mais complexos como rearranjo interno então a produção deste fragmento implica a formação de espécies neutras radicalares  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{NH}_2\cdot$  e também  $\text{CH}_3\cdot$  ou  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2\cdot$  resultantes da fragmentação das cadeias laterais da alanina e valina, respectivamente. Espécies estas altamente reactivas em meio biológico, podendo causar quebras de ligações ou formar novas espécies.

#### - $\text{CN}^-/\text{C}_2\text{H}_2^-$ (26 u.m.a.)

Este fragmento foi identificado para a alanina e para a valina em vários trabalhos anteriores como  $\text{CN}^-$ <sup>[22][30][32]</sup> e mais tarde por Denifl *et al.*<sup>[33]</sup> também como  $\text{C}_2\text{H}_2^-$  para a valina. Considerando a semelhança entre a alanina e valina e a presença de  $\text{C}_2\text{H}_2^-$  em estudos similares com glicina<sup>[52]</sup> é também provável a formação deste fragmento para a alanina. Em todos estes trabalhos foram identificadas ressonâncias a 1-3 eV, 5-6 eV e a 9 eV. Denifl *et al.* associaram a formação do  $\text{CN}^-$  principalmente a uma ressonância a 2,5 eV e o fragmento  $\text{C}_2\text{H}_2^-$  a duas ressonâncias a 0,8 e 3 eV e assim ambos estão presentes em todos os espectros efectuados. Papp *et al.*<sup>[32]</sup> sugere que a formação do fragmento  $\text{CN}^-$  a tão baixas energias resulta de um rearranjo interno da valina de forma semelhante ao também apresentado nesse trabalho para a glicina em que o TNI para além do anião dá origem a fragmentos neutros que incluem o  $\text{COOH}$ ,  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$ , resultante da cadeia lateral. Mais uma vez, devido à semelhança das moléculas, é provável que para a alanina aconteça de forma semelhante.

Do ponto de vista biológico, à semelhança do que acontece para a massa 45 u.m.a. associada ao grupo carboxila, a formação deste fragmento resulta na desagregação do aminoácido, que a estar incluído numa cadeia peptídica causaria a sua ruptura. À semelhança dos outros fragmentos aniónicos produzidos, o cianeto é uma espécie reactiva. No entanto, este composto tem uma toxicidade superior aos restantes, o que se deve ao facto de inibir a enzima citocromo c oxidase, impossibilitando o transporte de electrões desta enzima para o oxigénio nas mitocôndrias, impedindo a produção aeróbica de ATP, o que pode comprometer a sobrevivência da célula.<sup>[56]</sup>

#### - $\text{OH}^-$ (17 u.m.a.)

Este fragmento foi identificado em vários estudos para a alanina<sup>[22][29][30]</sup> e valina<sup>[32][33]</sup>. Para a alanina aparece associado a ressonâncias a 3,2; 5,45 e 9,2 eV e para a valina a 5,3 e 8,1 eV. No seguimento do trabalho de Papp *et al.*<sup>[32]</sup>, Denifl *et al.*<sup>[33]</sup> confirmaram a existência de apenas este fragmento para esta massa, confirmando a proposta de Ptasińska *et al.*<sup>[22]</sup> da não formação de  $\text{NH}_3^-$  devido à sua afinidade electrónica negativa. Este fragmento está presente em todas as energias de colisão, para ambas as moléculas, pois as ressonâncias *core excited* centradas em 5 eV têm início a cerca de 4,5 eV e as energias disponíveis para a alanina e valina nos espectros de mais baixa energia são 5,0 e 5,8 eV, respectivamente, de acordo com os valores da tabela 5.1.

**- O<sup>-</sup>/NH<sub>2</sub><sup>-</sup> (16 u.m.a.)**

Estes fragmentos foram identificados em vários estudos para a alanina<sup>[22][29]</sup> e valina<sup>[33]</sup>. Para a alanina associada a ressonâncias *core excited* a 5,0 e 9,6 eV e para a valina a 4, 6, 9 e 12 eV. Denifl *et al.*<sup>[33]</sup> mostraram a existência de dois picos associados a esta massa, um para cada fragmento, estando o NH<sub>2</sub><sup>-</sup> associado às ressonâncias centradas em 6 e 9 eV e o O<sup>-</sup> associado às ressonâncias a 4, 9 e 12 eV. Ambos os fragmentos estão presentes em todos os espectros efectuados uma vez que a primeira ressonância associada ao NH<sub>2</sub><sup>-</sup> começa a cerca de 4 eV. Este grupo considera que o fragmento O<sup>-</sup> apenas pode ter origem em contaminações de H<sub>2</sub>O para ressonâncias acima de 6 eV. No entanto esse mesmo grupo não descarta a possibilidade deste fragmento ser proveniente de TE com CO<sub>2</sub> pois esta molécula é o principal produto da fragmentação térmica destes aminoácidos e a energia à qual é formado O<sup>-</sup> para esta molécula é 4,4 eV, valor englobado pelas ressonâncias a 4-6 eV detectadas para ambas as moléculas<sup>[33]</sup>. Apesar de as temperaturas utilizadas neste estudo serem inferiores aos limiares de decomposição térmica não podemos garantir que não existe uma pequena fracção de moléculas resultantes da decomposição térmica nos feixes efusivos produzidos.

**- CH<sub>2</sub><sup>-</sup> (14 u.m.a.)**

Este fragmento foi detectado por Abdoul-Carime *et al.*<sup>[29]</sup> para CED em filmes finos de alanina associado a ressonâncias de 7,1 e 10,2 eV. Estes valores estão coerentes com os nossos resultados, pois para a alanina este fragmento é observado em todos os espectros excepto no de menor energia, onde a energia disponível é, de acordo com a tabela 5.1, apenas 5 eV. Nesse estudo é também proposto que este fragmento tem origem na cadeia lateral da alanina, constituído por um grupo metilo (CH<sub>3</sub>), sendo propostas duas vias de fragmentação, em que o terceiro átomo de hidrogénio do grupo metilo fica ligado ao carbono central da alanina ou em que se torna num radical neutro. Para a valina este fragmento também aparece, mas apenas a altas energias. Uma possível explicação pode estar relacionada com a maior complexidade da cadeia lateral desta molécula cujo maior número de graus de liberdade dá origem a mais locais de fragmentação que podem ser mais favoráveis para baixas e médias energias.

Do ponto de vista biológico, este fragmento é relevante não só pela possibilidade de formação de radicais H• mas também por uma das duas vias de fragmentação poder transformar a alanina em glicina, o que comprometerá a conformação de uma proteína onde a molécula esteja inserida, reduzindo ou até incapacitando a sua funcionalidade.

**- H<sup>+</sup> (1 u.m.a.)**

Este fragmento foi identificado por Abdoul-Carime *et al.*<sup>[29]</sup> e Ptasińska *et al.*<sup>[22]</sup> para a alanina. O primeiro estudo, em filmes finos, associou este fragmento a ressonâncias de 9,6; 10,1 e 11,9 eV e o segundo a 5,7 e 9,0 eV. Estas ressonâncias não explicam a presença deste fragmento nos espectros a

15 eV. Estudos publicados para a glicina em TE por Ferreira da Silva *et al.*<sup>[52]</sup> verificaram que a produção deste fragmento era complementar à produção do anião progenitor desidrogenado. De igual modo, a mesma tendência neste trabalho poderá ser a justificação para a presença desse fragmento a baixa energia.

### 5.3.2.2 Aniões detectados pela primeira vez

Neste trabalho foram detectados seis novos fragmentos, correspondentes às razões massa/carga de 12 ( $C^-$ ), 13 ( $CH^-$ ), 24 ( $C_2^-$ ) e 25 ( $C_2H^-$ ) para ambas as moléculas e 59 ( $CHNO_2^-/C_2H_3O_2^-$ ) e 71 ( $C_4H_9N^-$ ) para a valina. Os primeiros 4 fragmentos aparecem para todas as energias em ambas as moléculas e foram já reportados para a glicina por Ferreira da Silva *et al.*<sup>[52]</sup>. Recorrendo à literatura disponível<sup>[57]</sup> sobre as entalpias de formação destes fragmentos, concluímos que os valores encontrados para os três primeiros fragmentos, com valores  $\Delta_f H^0(C^-) = 6,17$  eV,  $\Delta_f H^0(CH^-) = 6,56$  eV e  $\Delta_f H^0(C_2^-) = 5,17$  eV, não justificam a presença destes fragmentos nos espectros a 15 eV de acordo com os valores da tabela 5.1, o que nos leva a concluir que devem existir outros mecanismos para a formação destes fragmentos para energias inferiores. Em relação ao fragmento  $C_2H^-$  este mesmo grupo propõe que resulta de um rearranjo da molécula e que o valor relativamente alto da sua afinidade electrónica<sup>[52]</sup> é a razão da sua presença a baixas energias.

O fragmento com massa/carga 59 aparece em todos os espectros da valina. Recorrendo à literatura disponível sobre fragmentos aniónicos, encontrámos dois possíveis fragmentos para este anião,  $CHNO_2^-/C_2H_3O_2^-$ , ambos possíveis apenas por rearranjo interno da molécula. Estudos efectuados para a valina<sup>[32][33]</sup> identificam dois possíveis fragmentos, também apenas possível por rearranjo interno, para a massa/carga 56, nomeadamente  $C_3H_4O^-$  e  $C_3H_6N^-$ . Uma possibilidade para a formação destes fragmentos com massa/carga 59 pode estar relacionada com a presença do catião potássio que poderá estabilizar o TNI tempo suficiente para a formação destes fragmentos com massa ligeiramente superior em oposição ao que foi detectar pelos estudos de CED com electrões livres.

O fragmento com massa/carga 71 foi detectado para a valina para todas as energias, decrescendo à medida que aumentamos a energia disponível. Estudos efectuados para a valina<sup>[32][33]</sup> identificam a perda do grupo COOH para a massa/carga 72. Com base neste fragmento sugerimos que o fragmento detectado no nosso trabalho advém da perda do grupo carboxila e de um átomo de hidrogénio. Se considerarmos que este fragmento se forma simplesmente através da quebra de ligações químicas, então é provável que o átomo de hidrogénio radicalar que se liberta é o que está ligado ao carbono central, uma vez que de acordo com Papp *et al.*<sup>[32]</sup>, a formação do anião progenitor desidrogenado pela perda do hidrogénio ligado ao carbono central foi tentativamente associada a um pico a 1,4 eV. É possível também que o anião progenitor desidrogenado formado por essa via seja o precursor deste fragmento.

Para além destes seis novos fragmentos, foram identificados outros dois fragmentos com razão massa/carga 17,5 e 48 bastante intensos que consideramos serem provenientes de decaimento metastável do anião progenitor desidrogenado durante o seu tempo de voo. Recorrendo à literatura<sup>[57]</sup> tentámos encontrar um fragmento possível para o pico centrado em 48, mas o único fragmento encontrado é  $\text{NO}^+\cdot\text{H}_2\text{O}$ , que é uma forma hidratada do anião  $\text{NO}^+$  cuja formação é muito pouco provável tendo em conta os processos envolvidos no nosso estudo pois implicaria não só a formação do anião  $\text{NO}^+$  mas também a de uma molécula de água resultante de uma segunda colisão, o que seria viável a existirem agregados moleculares no feixe efusivo o que não é possível no presente processo.

### 5.3.2.3 Picos não identificados

Os picos não identificados nos espectros apresentados não foram removidos pela subtracção da linha de base pois apresentavam intensidades iguais a outros picos identificados. No entanto estes picos são esporádicos e não foi possível atribuí-los à formação de um qualquer fragmento, sendo provável que sejam apenas ruído ou artefactos resultantes da subtracção dos brancos. No entanto não podemos descartar a hipótese de corresponderem a algum fragmento nunca antes reportado e como tal deixámo-los nos espectros para referência futura.

### 5.3.2. Fracções aniónicas

O conceito de fracção aniónica permite a análise da evolução dos vários canais de fragmentação com a variação da energia disponível e traduz-se pela intensidade de um determinado canal de fragmentação a dividir pela soma de todos os canais considerados. O cálculo das fracções aniónicas foi feito somente para a alanina uma vez que para a valina os espectros foram obtidos com tempos de extracção diferentes, o que afecta a detecção de determinados fragmentos e consequentemente o peso da sua contribuição.

Os picos não identificados foram ignorados nos cálculos das fracções aniónicas.

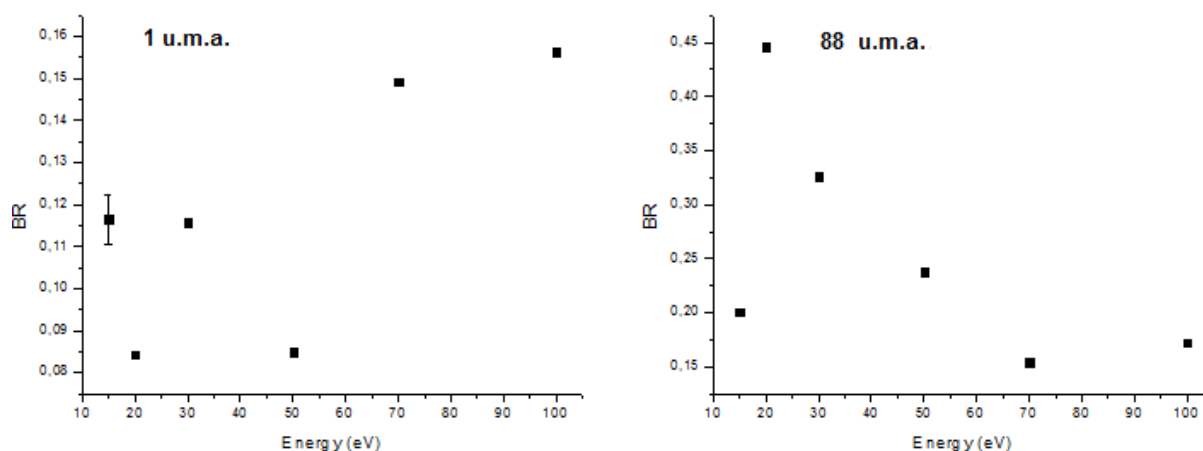


Figura 5.7 – Fracções aniónicas (Branching ratio) dos fragmentos de massa/carga 1 e 88 u.m.a.



A informação obtida destes gráficos parece confirmar a proposta de que a produção de  $H^-$  é complementar à produção do anião progenitor desidrogenado. Ao observar ambos os gráficos verificamos a tendência decrescente da produção da massa 88 enquanto que o gráfico para a massa 1 apresenta uma tendência inversa.

A diminuição de intensidade a 20 eV para a massa 1 prende-se com o aumento repentino da formação do ião progenitor desidrogenado, não tendo sido encontrada uma justificação conclusiva para o decréscimo acentuado a 50 eV. Comparando os espectros a 30 e 50 eV, concluímos que esta perda resulta em larga medida do aumento considerável da intensidade dos fragmentos associados às massas 16 e 17.5, sendo este último o mais intenso no espectro a 50 eV.

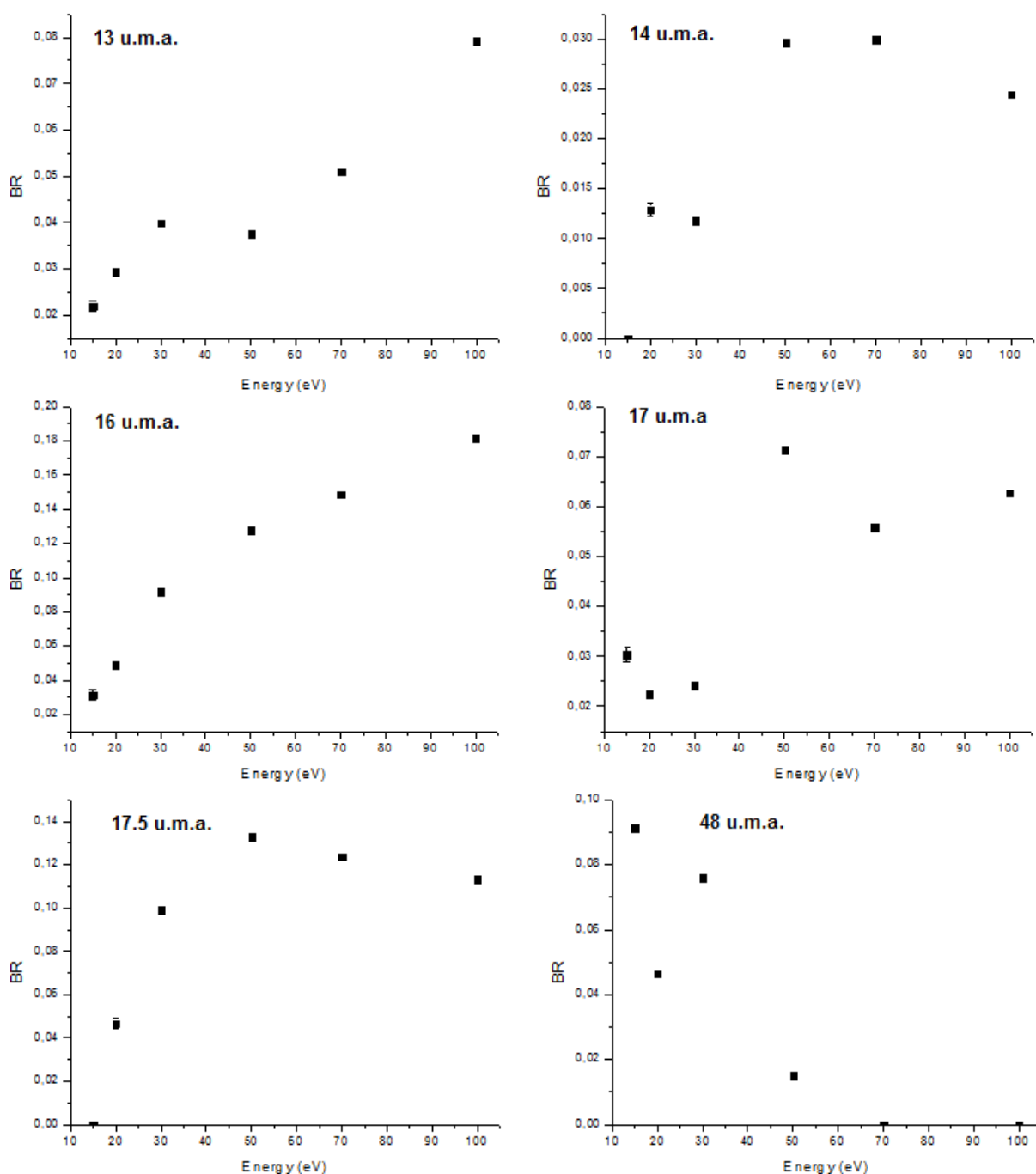


Figura 5.8 – Fracções aniónicas (Branching ratio) dos fragmentos de massa/carga 13,14, 16, 17, 17.5 e 48 u.m.a.

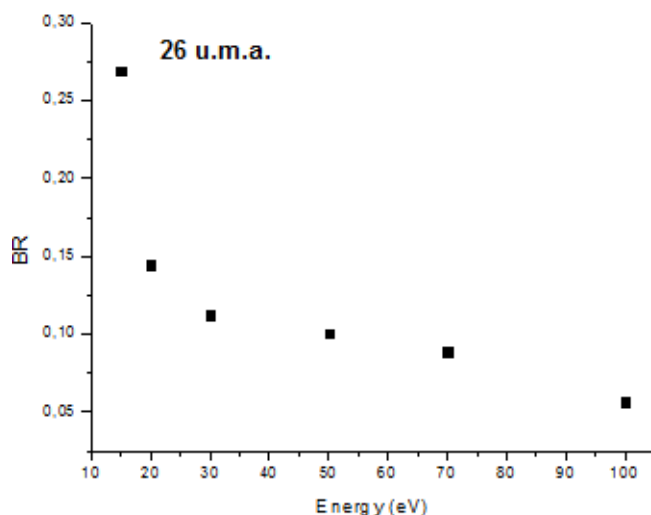


Figura 5.9 – Frações aniônicas (Branching ratio) do fragmento de massa/carga 26 u.m.a.

Os gráficos para as massas 13, 14, 16 e 17 apresentam uma tendência de crescimento da intensidade dos respectivos fragmentos com o aumento da energia disponível. Já os fragmentos associados à massa 26 apresentam um decréscimo com o aumento da energia disponível, sendo provável o favorecimento de outros canais de fragmentação.

Os fragmentos associados ao decaimento metastável apresentam um comportamento peculiar. O fragmento associado à massa/carga 17,5 tem um aumento da sua intensidade até 50 eV decrescendo um pouco até 100 eV. Já o fragmento associado à massa/carga 48 tem um comportamento decrescente entre os espectros a 15 e 50 eV, não aparecendo a energias superiores. É possível que sejam canais de dissociação concorrentes a baixas e médias energias e que o aumento da energia disponível favoreça a formação de fragmentos mais leves.

## Capítulo 6 Conclusões e trabalho futuro

### 6.1. Conclusões

No presente estudo apresentamos os espectros de massa do tipo TOF obtidos em colisões de átomos de potássio com moléculas de alanina e valina. A principal característica encontrada é a diminuição da intensidade relativa do anião progenitor desidrogenado com o aumento da energia de colisão. Esta característica é mais visível nos espectros da alanina do que nos da valina, sendo a fraca intensidade deste anião nos espectros da valina atribuída à estabilização deste aminoácido conferida pela sua cadeia lateral.

Para baixas energias, a formação de fragmentos aniónicos deve-se à inibição no processo de auto-libertação do electrão do TNI, devido à estabilização coulombiana no complexo de colisão, pela presença do ião  $K^+$ . Para energias de colisão mais elevadas, o padrão de fragmentação é interpretado através do aumento de energia disponível assim como pelo possível decaimento metastável de fragmentos mais pesados, nomeadamente do anião progenitor desidrogenado.

Em comparação com estudos anteriores de CED foram detectados 6 novos fragmentos. Destes, os fragmentos com massa/carga 17,5 e 48 u.m.a. foram tentativamente atribuídos a decaimento metastável. Os restantes fragmentos 12, 13, 24 e 25 u.m.a. foram identificados como  $C^-$ ,  $CH^-$ ,  $C_2^-$  e  $C_2H^-$ , respectivamente.

Do ponto de vista da biomedicina, os resultados obtidos por este estudo são muito relevantes no campo da medicina nuclear e da radioterapia. Os fragmentos aniónicos formados têm o potencial de reagir com o meio celular causando rupturas de ligações ou dando origem a novas espécies, sendo o mais proeminente destes aniões o fragmento com massa 26 u.m.a. que dá origem ao anião cianeto, conhecido pela sua elevada toxicidade. Apesar de neste trabalho só serem detectados fragmentos aniónicos, é possível conhecer a composição de alguns fragmentos neutros formados na colisão. Estes implicam a formação de radicais neutros como o  $H^\bullet$ ,  $O^\bullet$  e  $OH^\bullet$ , espécies altamente reactivas em meio celular, estando as últimas duas envolvidas no stress oxidativo, condição associada ao envelhecimento celular. Tendo em conta os fragmentos identificados pela primeira vez, podemos concluir que se o processo de TE é o mais adequado aos processos de degradação de moléculas biológicas por interacção com electrões então a presença destes fragmentos coloca sérias questões quanto à integridade dos aminoácidos em meio biológico.

### 6.2. Trabalho futuro

Para trabalho futuro será interessante estudar ambos os aminoácidos deuterados em diferentes posições, de forma a identificar a origem do fragmento  $H^-$ . Seria igualmente útil na determinação de algumas vias de fragmentação tal como a que dá origem à formação de  $CH_2^-$  na alanina, para aferir se ambas as vias propostas estão presentes ou se só uma delas ocorre e qual.

Relativamente à valina seria desejável refazer as medições utilizando o mesmo tempo de extracção para todas as energias como foi feito para a alanina, de forma a se poder calcular as fracções aniónicas.

Seria também interessante averiguar se a origem dos fragmentos de massa/carga 17,5 e 48 u.m.a. atribuídos neste trabalho a decaimento metastável são de facto provenientes de fragmentação de outras espécies como o anião progenitor desidrogenado, através de espectrometria de massa de dupla focagem.

Para complementar os resultados obtidos neste estudo seria útil estudar outros aminoácidos e moléculas com estruturas em comum com os aminoácidos como o ácido acético, ácido fórmico e compostos com grupos amina.

No que toca ao aparelho utilizado, a instalação de um analisador de energia para medir a perda de energia do feixe de potássio após a colisão com o feixe molecular efusivo permitiria tirar mais conclusões no que diz respeito à energia de formação de cada um dos fragmentos detectados bem como dos estados acessíveis no processo de transferência de carga, i.e. de colisão.

## Referências

- [1] B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M.A. Huels, and L. Sanche, "*Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons*". Science, 2000, Vol 287, pp. 1658-1660.
- [2] A. Lehninger, *Biochemistry*, Worth Publishers, 1970.
- [3] B. D. Michael, P. O'Neil, "*Molecular biology - A sting in the tail of electron tracks*", Science, 2000, Vol 287, pp. 1603-1604.
- [4] J. K. Wolken, E. A. Syrstad, S. Vivekananda, F. Turecek, "*Uracil radicals in the gas phase: Specific generation and energetics*", J. Am. Chem. Soc., 2001, Vol 123, pp. 5804-5805
- [5] S. Ptasíńska, S. Denifl, V. Grill, T. D. Mark, E. Illenberger, P. Scheier, "*Bond- and site-selective loss of H- from pyrimidine bases*", Phys. Rev. Lett., 2005, Vol 95
- [6] Sanche, L., "*Low energy electron-driven damage in biomolecules*". European Physical Journal D, 2005, Vol 35, pp. 367-390
- [7] Alizadeh, E. and Sanche, L., "*Precursors of Solvated Electrons in Radiobiological Physics and Chemistry*" Chem. Rev., 2012, Vol 112, pp. 5578-5602
- [8] E. Benizri, A. Ginouv and E. Berra, "*The magic of the hypoxia-signaling cascade*". Cell Mol Life Sci., 2008, Vol 65, pp. 1133-1149
- [9] G. Warias, H. Ahsan, "*Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions*", Journal of carcinogenesis, 2006, Vol 5
- [10] S. Denifl, S. Ptasíńska, M. Probst, J. Hrusak, P. Scheier, T. D. Märk, "*Electron attachment to the gas-phase DNA bases cytosine and thymine*", J. Phys. Chem. A, 2004, Vol. 108, pp. 6562-6569.
- [11] D. Almeida, F. Ferreira da Silva, G. Garcia, P. Limao-Vieira, "*Selective Bond Cleavage in Potassium Collisions with Pyrimidine Bases of DNA*", Phys. Rev. Lett., 2013, Vol 110
- [12] M. A. Huels, B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting and L. Sanche, "*Single, double, and multiple double strand breaks induced in DNA by 3-100 eV electrons*". J. Am. Chem. Soc., 2003, Vol 125, pp. 4467-4477
- [13] D. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 84th Edition, CRC Press, 2003
- [14] [http://www.ias.ac.in/initiat/sci\\_ed/resources/chemistry/3\\_Com.pdf](http://www.ias.ac.in/initiat/sci_ed/resources/chemistry/3_Com.pdf), (Agosto 2013).
- [15] C. Matias "*Decomposição do Uracilo por colisões átomo molécula - formação do anião NCO*" tese de mestrado integrado em Engenharia Física, UNL, Lisboa (2011)
- [16] P. Limão-Vieira, "*Fragmentação de iões negativos de halobenzenos induzida por colisão*". UNL, Lisboa (1999).
- [17] R. Antunes "*The Role of Halouracils in Radiotherapy studied by Electron Transfer in Atom-Molecule collision*" dissertação de doutoramento em Engenharia Física UNL, Lisboa (2011)
- [18] A.W. Kleyn, "*Vibronic Excitation in Atom Molecule Collisions*" in Physics, Universiteit Van Amsterdam (1980)

- [19] H. R. Horton *et al*, *Principles of biochemistry*, Second Edition, Prentice-Hall, 1996
- [20] R. F. Doolittle, "Redundancies in protein sequences", in G. D. Fasman, *Prediction of Protein Structures and the Principles of Protein Conformation*, New York: Plenum, 1989, pp. 599–623
- [21] R. Murray *et al*, *Harper's Illustrated Biochemistry*, 29th Edition, McGraw-Hill Medical, 2012
- [22] S. Ptasíńska, S. Denifl, P. Candori, S. Matejčík, P. Scheier, T.D. Märk, "Dissociative electron attachment to gas phase alanine" *Chemical Physics Letters*, 2005, Vol 403, pp. 107–112
- [23] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a7627> (Agosto 2013)
- [24] <http://www.ajinomoto.com.br/produtos-industria/alimentos-bebidas/alanina> (Agosto 2013).
- [25] <http://www.aminomics.com/aminoacids/valine.htm> (Agosto 2013)
- [26] M. R. Waterman, G. L. Cottam, "Molecular Aspects of Sickle Cell Disease" *Angewandte Chemie International Edition in English*, December 1976, Vol 15, pp. 749–757
- [27] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/v0500> (Agosto 2013)
- [28] <http://www.ajinomoto.com.br/produtos-industria/alimentos-bebidas/valina> (Agosto 2013)
- [29] H. Abdoul-Carime, L. Sanche, "Alteration of Protein Constituents Induced by Low-Energy (<40 eV) Electrons. III. The Aliphatic Amino Acids" *J. Phys. Chem. B*, 2004, Vol 108, pp. 457–464
- [30] M. V. Muftakhov, P. V. Shchukin, "Resonant dissociative electron capture by the simplest amino acids and dipeptides" *Russian Chemical Bulletin International Edition*, 2010, Vol 59, pp. 896–911
- [31] P. V. Shchukin, M. V. Muftakhov, J. Morré, M. L. Deinzer, Y. V. Vasil'ev, "High resolution mass analysis of N- and C-terminal negative ions resulting from resonance electron capture by aliphatic amino acids" *J. Chem. Phys.*, 2010, Vol 132, pp. 234–306
- [32] P. Papp, J. Urban, S. Matejčík, M. Stano, O. Ingolfsson, "Dissociative electron attachment to gas phase valine: A combined experimental and theoretical study", *J. Chem. Phys.*, 2006, Vol 125, pp. 204–301
- [33] S. Denifl, H. D. Flosadóttir, A. Edtbauer, O. Ingólfsson, T. D. Märk, P. Scheier "A detailed study on the decomposition pathways of the amino acid valine upon dissociative electron attachment" *Eur. Phys. J. D*, 2010, Vol 60, pp. 37–44
- [34] P. Papp, P. Shchukin, J. Kočíšek, Š. Matejčík, "Electron ionization and dissociation of aliphatic amino acids" *J. Chem. Phys.*, 2012, Vol 137, pp. 105–101
- [35] Y. V. Vasil'ev, B. J. Figard, V. G. Voinov, D. F. Barofsky, M. L. Deinzer, "Resonant Electron Capture by Some Amino Acids and Their Methyl Esters" *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, Vol 128, pp. 5506–5515
- [36] V. Vizcaino, P. Bartl, D. Gschliesser, S. E. Huber, M. Probst, T. D. Märk, P. Scheier, S. Denifl, "Dissociative Electron Attachment to  $\beta$ -Alanine" *ChemPhysChem*, 2011, Vol 12, pp. 1272–1279
- [37] K. Aflatooni, B. Hitt, G. A. Gallup, P. D. Burrow, "Temporary anion states of selected amino acids" *J. Chem. Phys.*, 2001, Vol 115, pp. 6489–6494
- [38] M. Allan "Electron Collisions with Formic Acid Monomer and Dimer" *Phys. Rev. Lett.*, 2007, Vol 98

- [39] V. S. Prabhudesai, D. Nandi, A. H. Kelkar, R. Parajuli, E. Krishnakumar, "*Dissociative electron attachment to formic acid*", Chem. Phys. Lett., 2005, Vol 405, pp. 172-176
- [40] T. N. Rescigno, C. S. Trevisan, A. E. Orel, "*Dynamics of Low-Energy Electron Attachment to Formic Acid*", Phys. Rev. Lett., 2006, Vol 96
- [41] A. Pelc, W. Sailer, P. Scheier, M. Probst, N. J. Mason, E. Illenberger, T. D. Märk, "*Dissociative electron attachment to formic acid (HCOOH)*", Chem. Phys. Lett., 2002, Vol 361, pp. 277-284
- [42] T. C. Freitas, M. T. N. Varella, R. F. da Costa, M. A. P. Lima, M. H. F. Bettega, "*Low-energy electron collisions with acetic acid*", Physical Review A, 2009, Vol 79, 022706
- [43] W. Sailer, A. Pelc, M. Probst, J. Limtrakul, P. Scheier, E. Illenberger, T. D. Märk, "*Dissociative electron attachment to acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH)*", Chem. Phys. Lett., 2003, Vol 378, pp. 250-256
- [44] J. Li, T. B. Brill, "*Decarboxylation Mechanism of Amino Acids by Density Functional Theory*" J. Phys. Chem. A, 2003, Vol 107, pp. 5993-5997
- [45] F. Ban, J. W. Gault, R. J. Boyd, "*Theoretical studies of the radiation products of hydroxyproline*", J. Phys. Chem. A, 2000, Vol 104, pp. 8583-8592
- [46] M. H. F. Bettega, "*Low-energy electron collisions with formic acid*", Phys. Rev. A, 2006, Vol 74
- [47] G. Martins, "*Transferência de electrão em bases de ADN por colisões átomo-molécula*", tese de mestrado integrado em Engenharia Física UNL, Lisboa (2010)
- [48] M. Lança, "*Degradação da Glicina por transferência de electrão em colisões átomo-molécula*", tese de mestrado integrado em Engenharia Biomédica UNL, Lisboa (2012)
- [49] D. Almeida, R. Antunes, G. Martins, S. Eden, F. Ferreira da Silva, Y. Nunes, G. Garcia, P. Limão-Vieira, "Electron transfer-induced fragmentation of thymine and uracil in atom-molecule collisions", Phys. Chem. Chem. Phys., 2011, Vol 13, pp. 15657-15665
- [50] F. Ferreira da Silva, D. Almeida, R. Antunes, G. Martins, Y. Nunes, S. Eden, G. Garcia, P. Limão-Vieira "Electron transfer processes in potassium collisions with 5-fluorouracil and 5-chlorouracil", Phys. Chem. Chem. Phys., 2011, Vol 13, pp. 21621–21629
- [51] R. Antunes, D. Almeida, G. Martins, N. J. Mason, G. Garcia, M. J. P. Maneira, Y. Nunes, P. Limão-Vieira, "Negative ion formation in potassium–nitromethane collisions", Phys. Chem. Chem. Phys., 2010, Vol 12, pp. 12513-12519
- [52] F. Ferreira da Silva, M. Lança, D. Almeida, G. García, P. Limão-Vieira, "Anionic fragmentation of glycine upon potassium-molecule collisions", Eur. Phys. J. D, 2012, Vol 66
- [53] A. Moutinho, M. Silva, M. Áurea Cunha, *Tecnologia de Vácuo*, 1ª edição, FCT/UNL, 1980
- [54] A. Savitzky, M. Golay, "*Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*", Analytical Chemistry, 1964, Vol 36, pp. 1627–1639
- [55] G.A. Gallup, P.D. Burrow, I.I. Fabrikant, "Electron-induced bond breaking at low energies in HCOOH and glycine: The role of very short-lived  $\sigma^*$  anion states" Phys. Rev. A, 2009, Vol 79
- [56] A. Lehninger *et al*, *Principles of Biochemistry*, Third Edition, Worth Publishers, 2000
- [57] <http://webbook.nist.gov/chemistry>





## Anexos

### Exemplo de subtração de linha de base

Apresentamos a título de exemplo o espectro a 20 eV calibrado para a alanina, antes e depois da subtração da linha de base.

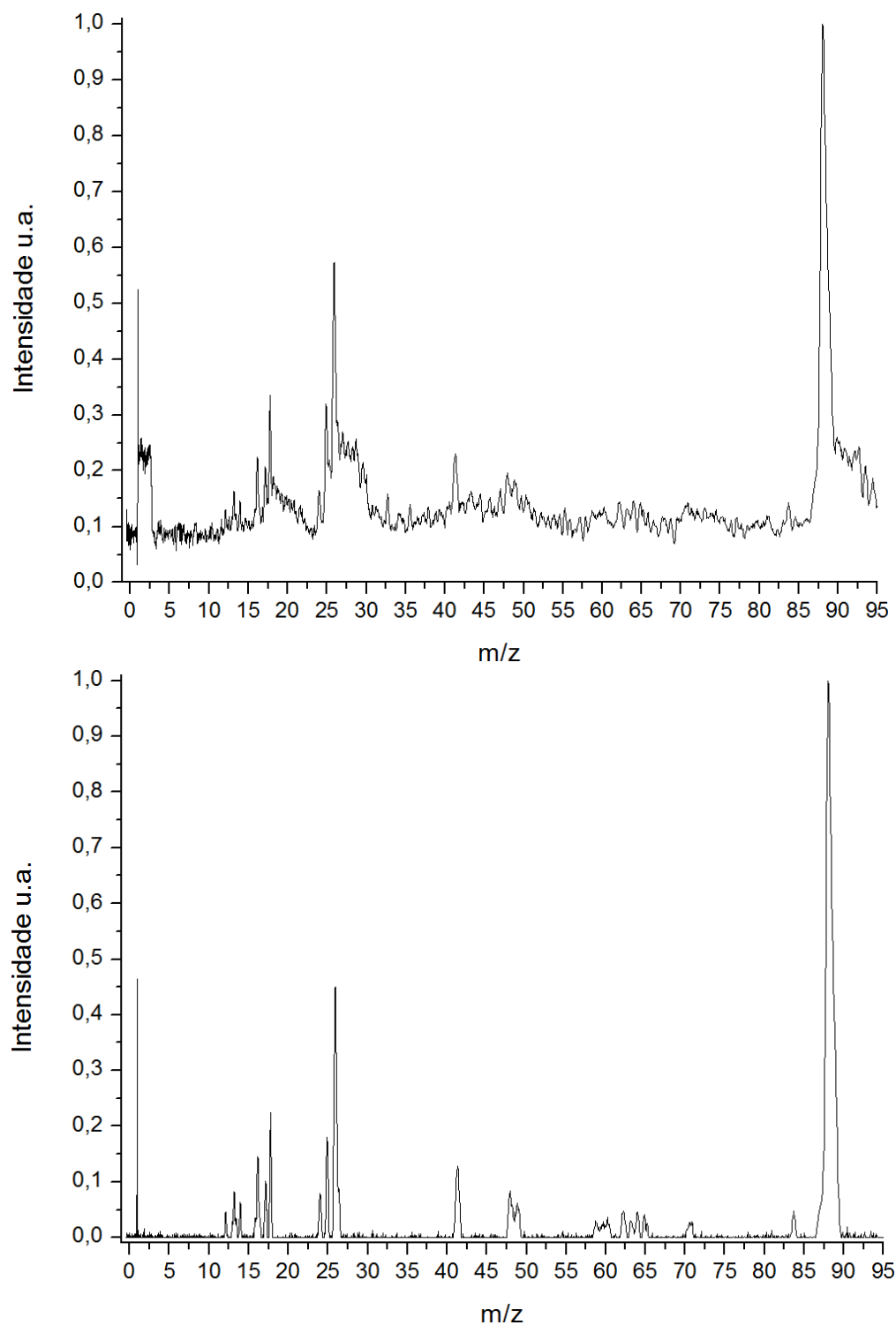


Figura 6.1 – Espectro para a alanina a 20 eV, antes e depois de subtrair a linha de base.

## The role of side chains in electron transfer induced fragmentation of amino-acids

F Ferreira da Silva<sup>1</sup>, J Rafael<sup>2</sup>, A Rebelo<sup>3</sup>, D Almeida<sup>4</sup> and P Limão-Vieira<sup>5</sup>

Laboratório de Colisões Atômicas e Moleculares, CEFITEC, Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

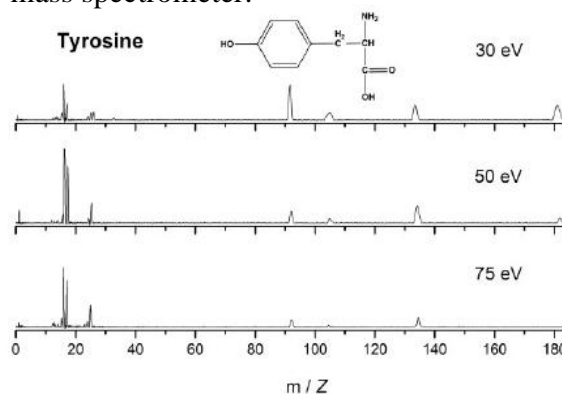
**Synopsis** We present negative ion formation driven by electron transfer in atom (K) molecule (amino acids) collisions, probing the influence of side chains in the decomposition mechanism.

The role of low energy electrons (LEEs) in the damaging capability of biological components has been the key point of many investigations. The seminal studies of Sanche and coauthors [1] proved for the first time that LEE impact on DNA/RNA induces single and double strand breaks that may lead to mutagenesis. As so, we have observed several gas phase studies that were carried out with different related molecules through dissociative electron attachment experiments. In the last few years, special attention has been given to electron transfer processes in potassium molecule collisions, where these have been proposed to describe more realistic the underlying processes involving interaction with biological related constituents.

Several studies have been performed in order to understand and compare how electron transfer can induce fragmentation in several DNA/RNA constituents and biological relevant molecules [2, 3]. In this communication, we present negative ion formation upon potassium collisions with different amino acids, in order to understand how the side chain can influence the fragmentation patterns. The results show that dissociation channels are dictated by the collision energy, and may differ strongly from DEA studies. In figure 1, we show the

results on the anion formation of tyrosine, an aromatic side chain amino acid. Tryptophan and phenylalanine were also studied in order to understand the influence of delocalized  $\pi$  electrons by the aromatic ring, which may dictate the fragmentation pathways. We observe an increase of lighter fragments with increasing collision energy and a strong decrease of dehydrogenated parent anion formation.

This study was performed by means of a crossed molecular beam setup, where a neutral hyperthermal potassium beam crosses with an effusive molecular target. The negative ions formed in the collision region were then accelerated into a TOF mass spectrometer.



**Figure 1.** Anion mass spectra for 30, 50 and 75 eV potassium impact on tyrosine.

<sup>1</sup> E-mail: [f.ferreiradasilva@fct.unl.pt](mailto:f.ferreiradasilva@fct.unl.pt)

<sup>2</sup> E-mail: [j.rafael@campus.fct.unl.pt](mailto:j.rafael@campus.fct.unl.pt)

<sup>3</sup> E-mail: [afc.rebelo@campus.fct.unl.pt](mailto:afc.rebelo@campus.fct.unl.pt)

<sup>4</sup> E-mail: [dalmeida@campus.fct.unl.pt](mailto:dalmeida@campus.fct.unl.pt)

<sup>5</sup> E-mail: [plimaovieira@fct.unl.pt](mailto:plimaovieira@fct.unl.pt)

### References

- [1] B Boudaifa *et al* 2009 *Science* **287** 1658
- [2] D Almeida *et al* 2011 *PCCP* **13** 15657
- [3] F Ferreira da Silva *et al* 2012 *Eur. Phys. J. D* **66** 78

